

---

# **MASTERARBEIT**

---

Frau Dip. Ing.  
**Allyn Große**

**Schonende Inaktivierung pro-  
karyontischer Keime durch  
atmosphärisches Plasma**

Mittweida, 2012

# **MASTERARBEIT**

---

## **Schonende Inaktivierung pro- karyontischer Keime durch atmosphärisches Plasma**

Autor:

**Frau Dipl. Ing.**

**Allyn Große**

Studiengang:

**Physikalische Technik**

Seminargruppe:

**PT09w1-M**

Erstprüfer:

**Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Steiger**

Zweitprüfer:

**Dr. rer. nat. Markus von Nickisch-Rosenegk**

Einreichung:

**Mittweida, 12. April 2012**

Verteidigung/Bewertung:

---

# MASTERTHESIS

---

## **Inactivation of bacteria by atmospheric plasma**

author:

**Ms. Dipl. Ing.**

**Allyn Große**

course of studies:

**Physikalische Technik**

seminar group:

**PT09w1-M**

first examiner:

**Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Steiger**

second examiner:

**Dr. rer. nat. Markus von Nickisch-Rosenegk**

submission:

**Mittweida, 12. April 2012**

defence/ evaluation:

## **Bibliografische Beschreibung:**

Allyn Große:

Schonende Inaktivierung prokaryontischer Keime durch atmosphärisches Plasma. - 2012. - VII, 62, 5 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät MNI, Masterarbeit, 2012

## **Referat:**

Inhalt dieser Arbeit ist die Inaktivierung der Bakterienspezies *Pseudomonas fluorescens* mit atmosphärischem Plasma. Dazu wurde der verwendete Plasmagenerator in seinen physikalischen Eigenschaften charakterisiert. Mit Parametervariationen des Plasmas wurden die *Pseudomonaden* behandelt und ihr Wachstumsverhalten beobachtet.

## **Danksagung**

Diese Masterarbeit wurde am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) Potsdam-Golm und mit Unterstützung der Hochschule Mittweida durchgeführt.

Von Seiten der Hochschule Mittweida möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Bernhard Steiger danken. In sämtlichen physikalischen Fragen und Versuchsanregungen konnte ich auf seine Unterstützung bauen.

Herrn Prof. Dr. Frank Fabian Bier danke ich, dass ich diese Arbeit am Insitutsstandort Potsdam-Golm durchführen konnte.

Ich möchte Herrn Dr. Markus von Nickisch-Rosenegk danken, dass er mir diese Masterarbeit innerhalb seiner Arbeitsgruppe Technische Molekularbiologie ermöglichte. Dabei konnte ich auf das Fachwissen der gesamten Arbeitsgruppe, bestehend aus Sebastian Hoppe, Stefanie Arnold, Karsten Rapsch, Sebastian Kersting, Martina Obry und Simone Aubele zurückgreifen. Die Unterstützung der Arbeitsgruppe erwies sich in den biologischen Fragestellungen als große Hilfe.

Weiterhin möchte ich bei den Erbauern des Plasmagenerators, Dr. Matthias Griebner und André Lehmann, bedanken dass ich den Plasmagenerator für meine Versuche erweitern und verwenden konnte. Als Kollegen standen Dr. Matthias Griebner und André Lehmann in vielen weiteren Fragestellungen immer zur Verfügung wofür ich sehr dankbar bin.

Die Probenstücke wurden von Alexander Christmann gefräst. Dafür, und für seine nette Unterstützung bei technischen Fragestellungen, möchte ich mich bedanken.

Das zur Aufnahme des optischen Spektrums eingesetzte Faserspektrometer wurde mir vom Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung Potsdam-Golm zur Verfügung gestellt. Dafür möchte ich Dr. Sebastian Döring, Dr. Stefan Stuffer und Mark Bennemann danken.

Weiterhin möchte ich Dr. Katja Uhlig, Dr. Magnus Jäger, Beate Morgenstern und Michael Böttcher für die fachliche und soziale Unterstützung danken.

Auch an der Hochschule Mittweida konnte ich oftmals auf einen fachlichen Rat zurückgreifen. Dafür möchte ich Prof. Dr. Weißmantel, Manfred Glätzner, René Bertram, Hagen Grüttner und Peter Lickschat danken.

Meiner Familie und meinem Ehemann Frank Große möchte ich für ihre ununterbrochene Unterstützung und ihr immer wieder neu aufgebrachtes Verständnis danken.

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
Einheitenverzeichnis .....	IX
Abbildungsverzeichnis .....	XI
1. Einleitung .....	1
1. 1. Physikalische Grundlagen .....	2
1. 1. 1. Definition Plasma .....	2
1. 1. 2. Atmosphärisches Plasma .....	5
1. 2. Biologische Grundlagen .....	6
1. 2. 1. Inaktivierungsverfahren .....	6
1. 2. 2. Zellbiologische Wirkungen des Plasmas .....	8
1. 2. 3. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	12
2. Zielstellung und technisches Konzept .....	14
3. Material und Methoden .....	15
3.1. Aufbau des Plasmagenerators .....	15
3. 2. Charakterisierung der Plasmaflamme .....	19
3. 2. 1. Optisches Spektrum .....	19
3. 2. 2. Ozongehalt .....	22
3. 2. 3. Teilchenstrahlung .....	22
3. 3. Kultivierung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	23
3. 4. Bestrahlung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	25
3. 4. 1. Bestrahlung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> auf einer Kulturagaroberfläche .....	25
3. 4. 2. Bestrahlung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> als Zellsuspension .....	29
3. 4. 3. Bestrahlung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> auf Filterpapier .....	31

4.	Ergebnisse.....	34
4. 1.	Charakterisierung der Plasmaflamme.....	34
4. 1. 1.	Optisches Spektrum.....	34
4. 1. 2.	Ozongehalt.....	40
4. 1. 3.	Teilchenstrahlung.....	41
4. 2.	Bestrahlung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	42
4. 2. 1.	Bestrahlung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> auf einer Kulturagaroberfläche.....	42
4. 2. 2.	Bestrahlung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> als Zellsuspension.....	48
4. 2. 3.	Bestrahlung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> auf Filterpapier.....	51
5.	Diskussion.....	56
6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	61
7.	Anhang.....	63
8.	Literaturnachweis.....	68

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Wechselspannung
Ar	Argon
CCD	Charge-coupled Device („ladungsgekoppeltes Bauteil“)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM-Nr.	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Nummer
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyriboseacid
D-Wert	dezimale Reduktionszeit
EN	Europäische Norm
IR	infrarot
N	Stickstoff
N <sub>2</sub>	Stickstoffmolekül
O	Sauerstoff
O <sub>2</sub>	Sauerstoffmolekül
O <sub>3</sub>	Ozon
UV	ultraviolett



## Einheitenverzeichnis

nm	Wellenlänge in Nanometer
µm	Länge in Mikrometer
mm	Länge in Millimeter
cm	Länge in Zentimeter
m	Länge in Meter
ms	Zeit in Millisekunden
s	Zeit in Sekunden
min	Zeit in Minuten
h	Zeit in Stunden
g	Gewicht in Gramm
µl	Volumen in Mikroliter
ml	Volumen in Milimeter
l	Volumen in Liter
µg / m <sup>3</sup>	Konzentration in Mikrogramm pro Kubikmeter
µg / ml	Konzentration in Mikrogramm pro Milliliter
ppb	Konzentration in pounds per billion
Zellen / ml	Zellkonzentration in Zellen pro Milliliter
A	Stromstärke in Amper
eV	Spannung in Elektronenvolt
V	Spannung in Volt
kV	Spannung in Kilovolt
Hz	Frequenz in Herz
J / mol	Energie in Joule pro mol
kJ / mol	Energie in Kilojoule pro mol
counts/ms	Intensität in counts pro Millisekunde

bar	Druck in Bar
%	Verhältnis in Prozent
°C	Temperatur in Grad Celsius
m/s	Geschwindigkeit in Meter pro Sekunde
rpm	Rotation in rounds per minute
g	Beschleunigung in
kGy	Strahlendosis in Kilogray
u	Atommasse in unified atomic mass unit

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Schematische Darstellung der Plasmadüse .....	6
Abbildung 2: Wechselwirkung Elektronen und Photonen .....	8
Abbildung 3: Ozonolyse .....	10
Abbildung 4: Fotografie des Plasmagenerator-Aufbaus im Labor .....	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung und Fotografie des Plasmakopfes .....	16
Abbildung 6: Positionierung der Probe .....	17
Abbildung 7: Prinzip des Ozondeckels .....	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Czerny-Turner-Spektrometers .....	20
Abbildung 9: Messaufbau zur Aufnahme des optischen Spektrums .....	21
Abbildung 10: Linienprofil einer Spektrallinie .....	22
Abbildung 11: gefriergetrocknete Ampulle .....	24
Abbildung 12: 4 x 4 – Rastermuster auf den Kulturagarplatten .....	25
Abbildung 13: Verwendung von Agarabklatschplatten .....	26
Abbildung 14: variierte Plasmamaparameter auf Kulturagar .....	27
Abbildung 15: Bestrahlungsversuche der Zellsuspension .....	29
Abbildung 16: Bestrahlungsversuche auf Filtermembranen .....	31
Abbildung 17: Emissionsspektrum Plasmagenerator Argon .....	34
Abbildung 18: Intensitätsänderung in Abhängigkeit von der Primärspannung (Argon) .....	35
Abbildung 19: Intensitätsänderung in Abhängigkeit vom Gasdruck (Argon) .....	35
Abbildung 20: Emissionsspektrum Plasmagenerator Stickstoff .....	36
Abbildung 21: Intensitätsänderung in Abhängigkeit von der Primärspannung (Stickstoff) .....	37
Abbildung 22: Intensitätsänderung in Abhängigkeit vom Gasdruck (Stickstoff) .....	37
Abbildung 23: Emissionsspektrum Plasmagenerator Sauerstoff .....	38
Abbildung 24: Intensitätsänderung in Abhängigkeit von der Primärspannung (Sauerstoff) .....	38
Abbildung 25: Intensitätsänderung in Abhängigkeit vom Gasdruck (Sauerstoff) .....	39
Abbildung 26: Strahlungsintensität der Wellenlänge 242 nm .....	40
Abbildung 27: Ozonkonzentration .....	40
Abbildung 28: Bestrahlung Kulturagar Variation Aktivgas Fotografie .....	42
Abbildung 29: Bestrahlung Kulturagar Variation Aktivgas graphische Darstellung .....	42
Abbildung 30: Bestrahlung Kulturagar Variation Primärspannung Fotografie .....	43
Abbildung 31: Bestrahlung Kulturagar Variation Primärspannung graphische Darstellung .....	43
Abbildung 32: Bestrahlung Kulturagar Variation Bestrahlungsdauer Fotografie .....	44

Abbildung 33: Bestrahlung Kulturagar Variation Bestrahlungsdauer graphische Darstellung.....	44
Abbildung 34: Bestrahlung Kulturagar Variation Vorinkubation Fotografie.....	45
Abbildung 35: Bestrahlung Kulturagar Variation Vorinkubation graphische Darstellung.....	46
Abbildung 36: Bestrahlung Kulturagar Negativ-Gas-Kontrolle Fotografie.....	46
Abbildung 37: Bestrahlung Kulturagar Negativ-Gas-Kontrolle graphische Darstellung.....	47
Abbildung 38: Bestrahlung Kulturagar Ozonkontrolle Fotografie.....	47
Abbildung 39: Bestrahlung Kulturagar Ozonkontrolle graphische Darstellung.....	48
Abbildung 40: Transmission Kulturmedium Nutrient-Broth No.2.....	48
Abbildung 41: Bestrahlung Zellsuspension Versuch 1.....	49
Abbildung 42: Bestrahlung Zellsuspension Versuch 2.....	50
Abbildung 43: Experimentelle Kalibrierung der Bakterienkonzentration Wachstumskurven.....	51
Abbildung 44: Experimentelle Kalibrierung der Bakterienkonzentration Regression.....	52
Abbildung 45: Bestrahlung Filtermembran Variation optische Dichte.....	53
Abbildung 46: Bestrahlung Filtermembran Variation Aktivgas.....	53
Abbildung 47: Bestrahlung Filtermembran Variation Primärspannung.....	54
Abbildung 48: Bestrahlung Filtermembran Variation Bestrahlungsdauer.....	54
Abbildung 49: Bestrahlung Filtermembran Variation Gasdruck.....	55

## 1. Einleitung

Plasma als vierter Aggregatzustand besitzt ein breites Anwendungsspektrum. In der Materialbearbeitung werden unterschiedliche Plasmatechnologien unter anderem in der Dünnschichttechnik und Oberflächenmodifizierung eingesetzt. Auch die Medizintechnik profitiert von unterschiedlichen Plasmaverfahren. So wird innerhalb der Beschichtungstechnik biofunktionaler Oberflächen häufig mit Plasmaverfahren gearbeitet und des Weiteren die Plasmatechnologie zur Oberflächensterilisation eingesetzt [Kramme, 2007; Wintermantel, 2009]. Ein neues Gebiet ist die Plasmamedizin innerhalb der Zahnmedizin und zur Förderung der Wundheilung [Kramer, 2010].

In der Mikrobiologie wird nach neuen Inaktivierungsverfahren von Bakterien zur Immunisierung von Tieren und Antikörpergewinnung geforscht. Dazu bietet sich die Plasmabehandlung von prokaryontischen Keimen an. Die Inaktivierung von Bakterien mittels Plasma wurde nachgewiesen [Laroussi, 2006] und soll den herkömmlichen Inaktivierungsmethoden als schonende aber wirkungsvolle Methode gegenüber gestellt werden. Bestehende und sehr häufig angewendete Inaktivierungsverfahren sind zum einen die Abtötung durch Wärmeeinwirkung und zum anderen die chemikalische Inaktivierung mittels Formaldehyd. Das Resultat dieser herkömmlichen Methoden sind denaturierte Bakterien deren Membranen perforiert sind oder deren Struktur, DNA und Proteine stark verändert sind [Einschütz, 2004; Wintermantel, 2009; Luttmann, 2009]. Eine Weiterbehandlung dieser Keime zur Antikörpergewinnung ist möglich, jedoch wird die Proteinspezifität der zu bildenden Antikörper durch die Denaturierung stark eingeschränkt. Die Inaktivierung durch UV-Bestrahlung und Gammabestrahlung eignen sich für die Antikörpergewinnung in höherem Maße, da vorwiegend die DNA und weniger die zellspezifischen Proteine zerstört werden [Hellweg, 2001; Czihak, 1990]. Jedoch ist die Gamma-Bestrahlung eine sehr aufwendige Methode und beide Bestrahlungsmethoden können nicht bei allen prokaryontischen Keimen angewendet werden. Zum Beispiel gilt *Deinococcus radiodurans* als Strahlen- und UV-resistent und kann nur mit sehr hohem Energieaufwand inaktiviert werden [Krisko, 2010]. Plasmaanwendungen hingegen stellen eine einfache und kostengünstige Möglichkeit zur schonenden Inaktivierung dar [Steinbüchel, 2003]. Dabei sollen die Vermehrungsfähigkeiten der Bakterien gehemmt werden, aber die Proteine in ihrer Struktur erhalten bleiben. Somit würde sich die Plasmabehandlung als Alternativmethode zur Inaktivierung von Keimen, welche anschließend zur Generierung von Antikörpern genutzt werden können, anbieten.

Innerhalb dieser Arbeit wird die Plasmabestrahlung als Inaktivierungsprozess den herkömmlichen Methoden gegenübergestellt.

## 1. 1. Physikalische Grundlagen

Die physikalischen Grundlagen beziehen sich auf die Plasmaphysik und die Plasmacharakterisierung.

### 1. 1. 1. Definition Plasma

Plasma bezeichnet den vierten Aggregatzustand und ist ein makroskopisches Vielteilchensystem. Dabei besteht Plasma aus freien elektrischen Ladungsträgern und Neutralteilchen. Ionisierte Atome, ionisierte Moleküle und Elektronen sind freie Ladungsträger und bestimmen im Wesentlichen die Eigenschaften des Plasmas in Bezug auf elektromagnetische Wechselwirkungen, welche zwischen den einzelnen Ladungsträgern und mit äußeren elektromagnetischen Feldern auftreten. Die Neutralteilchen können durch die auftretenden Wechselwirkungen sowohl im Grundzustand als auch im angeregten Zustand vorliegen [Weißmantel, 2009; Hering, 2002]. Das Plasma zeichnet sich trotz der freien Ladungsträger durch eine elektrische Quasineutralität aus.

Eine Klassifizierung von Plasmen kann nach Ionisationsgrad, thermischem Gleichgewicht und Gasdruck erfolgen.

#### *Ionisationsgrad*

Ausgehend von einer chemischen Reaktion gilt das Ionisationsgleichgewicht, in Formel 1 für einfache Ionisation dargestellt, zwischen Atomen, Ionen und Elektronen. Dabei wird von einem Gleichgewicht zwischen den Reaktionspartnern ausgegangen [Bergmann, 1992].



#### **Formel 1: Ionisationsgleichgewicht [Bergmann, 1992]**

mit	A...	nichtionisiertes Atom
	A <sup>+</sup> ...	einfach ionisiertes Atom
	e <sup>-</sup> ...	Elektron

Die Elektronen- und Ionendichte, sowie die Atomdichte sind von Druck und Temperatur abhängig und werden durch die Saha-Eggert-Gleichung (Formel 2) beschrieben.

$$\frac{n_e \cdot n_i}{n_a} = 2 \frac{Z_i(T)}{Z_a(T)} \left( \frac{m_e \cdot k_B \cdot T}{2\pi \cdot \hbar^2} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot e^{\left( -\frac{E_i - \Delta E_i}{k_B \cdot T} \right)}$$

**Formel 2: Saha-Eggert-Gleichung [Bergmann, 1992]**

mit	$n_e \dots$	Elektronendichte
	$n_i \dots$	Ionendichte
	$n_a \dots$	Atomdichte
	$Z_i(T) \dots$	Zustandssummen der Ionen in Abhängigkeit von der Temperatur T
	$Z_a(T) \dots$	Zustandssummen der Atome in Abhängigkeit von der Temperatur T
	$m_e \dots$	Elektronenmasse
	$k_B \dots$	Boltzmannkonstante
	$T \dots$	Temperatur
	$\hbar \dots$	Plancksches Wirkungsquantum
	$E_i \dots$	Ionisationsenergie

Die Saha-Eggert-Gleichung beschreibt den Ionisationsgrad eines Gases im thermischen Gleichgewicht. Dieser ist abhängig von der Temperatur. In Plasmen wird die Ionisationsenergie  $E_i$  um die für das jeweilige Plasma typische Erniedrigungsenergie  $\Delta E_i$  verringert. Die Erniedrigungsenergie  $\Delta E_i$  wird wie folgt beschrieben:

$$\Delta E_i \approx \frac{e^2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \frac{\lambda_D}{\sqrt{2}}}$$

**Formel 3: Erniedrigungsenergie [Bergmann, 1992]**

mit	$e \dots$	Elementarladung
	$\epsilon_0 \dots$	elektrische Feldkonstante
	$\lambda_D \dots$	Debye-Länge

Der Ionisationsgrad des Plasmazustandes beschreibt das Verhältnis der Elektronendichte zur Ionen- und Neutralteilchendichte:

$$x = \frac{n_e}{n_i + n_n}$$

**Formel 4: Ionisationsgrad [Weißmantel, 2009]**

mit	$x \dots$	Ionisationsgrad
	$n_n \dots$	Neutralteilchendichte

In dünnen Plasmen geht der Ionisationsgrad gegen 0 ( $x \ll 1$ ) und in dichten Plasmen nähert sich dieser dem Wert 1 ( $x \leq 1$ ). In dichten, vollionisierten Plasmen sind nahezu alle Atome und Moleküle ionisiert. Diese Plasmen werden auch als heiße Plasmen bezeichnet [Weißmantel, 2009; Bergmann, 1992].

### Thermisches Gleichgewicht

Da Diffusionsströme temperaturabhängig sind, ist auch die Beweglichkeit der Plasmabestandteile von der Temperatur abhängig. In Plasmen im vollständigen thermischen Gleichgewicht besitzen die schweren Teilchen (Moleküle, Atome und Ionen) die gleiche Temperatur wie die davon abgelösten Elektronen. Somit gilt der Energiegleichverteilungssatz:

$$\overline{W}_{\text{kin}} = k_B \cdot T$$

**Formel 5: Energiegleichverteilungssatz [Weißmantel, 2009]**

mit	$\overline{W}_{\text{kin}} \dots$	mittlere kinetische Energie der einzelnen Teilchen
	$k_B \dots$	Boltzmannkonstante
	$T \dots$	Temperatur

Ein vollständiges thermodynamisches Gleichgewicht kann nur in sehr dichten kalten Plasmen auftreten und ist sehr unwahrscheinlich. In weniger dichten aber heißen Plasmen tritt ein partielles thermodynamisches Gleichgewicht ein. Dabei gilt:

$$\overline{W}_{\text{kin}} \sim k_B \cdot T$$

**Formel 6: partielles thermodynamisches Gleichgewicht [Weißmantel, 2009]**

In sehr dünnen und heißen Plasmen ist kein thermodynamisches Gleichgewicht gegeben. Diese werden als nicht-thermische Plasmen bezeichnet, in denen die Elektronen eine wesentlich höhere Temperatur als die schweren Teilchen besitzen. In diesen Plasmen ist keine thermodynamische Beschreibung möglich [Weißmantel, 2009].

### Gasdruck

Für diese Arbeit von Interesse ist die Eingliederung in Druckbereiche: Niederdruckplasma, Hochdruckplasma und Atmosphärendruckplasma, da das in diesen Versuchen eingesetzte mikrobiologische Material Atmosphärendruck voraussetzt.

Als Niederdruckplasmen werden Plasmen im Druckbereich unterhalb des Normaldruckes bezeichnet. Niederdruckplasmen sind nicht-thermisch und die mittlere freie Weglänge der Elektronen ist größer als die Debye-Länge, was die Wahrscheinlichkeit für Stoßvorgänge wesentlich verringert und Temperatur- und Energieaustausch zwischen den Ladungsträgern mindert [Weißmantel, 2009].

Die Debye-Länge wird in der Plasmaphysik auch als Abschirmlänge bezeichnet. Sie gibt an, in welchem Abstand die potenzielle Energie der Ladung auf  $e^{-1}$  absinkt [Bergmann, 1992; Meschede, 2004].



$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k_B T}{e^2 n_e}}$$

**Formel 7: Debye-Länge [Bergmann, 1992]**

mit  $\lambda_D \dots$  Debye-Länge  
 $\epsilon_0 \dots$  elektrische Feldkonstante

Hochdruckplasmen werden in einem Druckbereich oberhalb des Atmosphärendruckes erzeugt. Dabei herrscht ein partielles thermodynamisches Gleichgewicht. Da die Ladungsträgerdichte in diesen Plasmen sehr hoch ist, kommt es verstärkt zu Stoßvorgängen, bei denen die Ladungsträger ihre Energie übertragen und ein Temperaturaustausch stattfindet [Weißmantel, 2009].

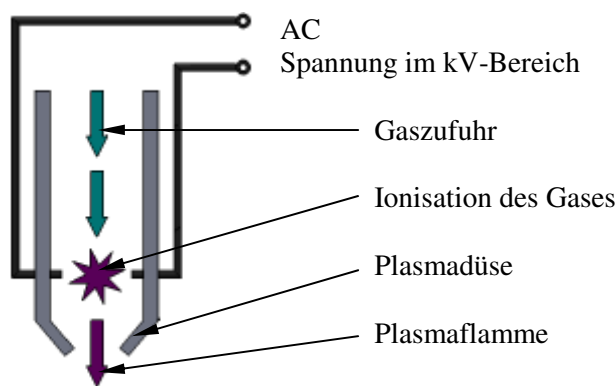
Die Ladungsträgerdichte in atmosphärischen Plasmen ist hoch. Stoßvorgänge treten verstärkt auf. Es herrscht ein partielles thermodynamisches Gleichgewicht und die mittlere freie Weglänge der Elektronen ist kleiner als die Debye-Länge [Wintermantel, 2009].

### 1. 1. 2. Atmosphärisches Plasma

In den Inaktivierungsversuchen wurde mit einem Atmosphärendruckplasma gearbeitet, da die verwendeten *Pseudomonas fluorescens* unter Normaldruckverhältnissen existieren und morphologisch auf diese Druckverhältnisse angepasst sind. Wird von den Normaldruckverhältnissen abgewichen, so können die Proteine der *Pseudomonaden* geschädigt oder zerstört werden. Bei Unterdruck wird das Bakterium aufgrund von Wasserentzugs inaktiviert [Bücker, 1968]. Wird das Bakterium in eine Hochdruckumgebung gebracht so diffundiert aufgrund des hydrostatischen Druckes  $\text{CO}_2$  in die Zelle. Dabei werden zum Beispiel bei einem Druck von 1000 bar mit einer Einwirkzeit von 48 h 90 % *Escherichia coli* deaktiviert [Stahl, 1985]. Sowohl der Wasserentzug, als auch die Diffusion von  $\text{CO}_2$  in die Zelle schädigt die zellspezifischen Proteine, welche für die spätere spezifische Immunisierung notwendig sind. Somit kann nicht mehr von einer schonenden, proteinerhaltenden Inaktivierung ausgegangen werden.

Die Anregung des Plasmas unter Normaldruck kann mit unterschiedlichen Energieformen erreicht werden, im vorliegenden Fall mittels elektrischer Plasmaanregung im Niederfrequenzbereich.

In der technischen Umsetzung eines Normaldruckplasmas wird vorwiegend, wie auch in den Versuchen dieser Arbeit, mit Plasmadüsen gearbeitet. Die Verwendung der Plasmadüse zeichnet sich dadurch aus, dass eine Bestrahlung der Probe möglich ist, ohne die Probe selbst als Kathode oder Anode zu schalten. Unabhängig von den Materialdicken sind keine Durchschläge möglich. Durch den angelegten Gasteilchenstrom werden die Ladungsträger aus der Plasmadüse heraus auf die Probe gedrückt [Wintermantel, 2009].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Plasmadüse**

An der Plasmadüse wird eine Spannung angelegt. Innerhalb der Düse entsteht ein Plasma (violett dargestellt), welches über einen Gasteilchenstrom aus der Düse heraus getragen wird. Es entsteht eine Plasmaflamme.

Über eine Wechselspannung im Hz- und kV-Bereich wird ein elektrisches Feld innerhalb der Düse erzeugt. Dabei wird das durch die Düse strömende Prozessgas mittels der Hochspannungsentladung in den Plasmazustand angeregt. Die Gasteilchen werden ionisiert oder gehen in einen angeregten Zustand über. Die Düse trägt gezielt zur Strahlformung bei.

## 1. 2. Biologische Grundlagen

Das folgende Kapitel beschreibt die Grundlagen der Inaktivierung prokaryontischer Keime. Des Weiteren wird das für die Versuche verwendete Bakterium *Pseudomonas fluorescens* beschrieben.

### 1. 2. 1. Inaktivierungsverfahren

Inaktivierung beinhaltet die Wachstumshemmung prokaryontischer Keime. Darin inbegriffen ist auch das Abtöten der im Ruhezustand befindlichen Keime (Sporen). Dabei wird unterschieden in physikalische (z. B.: Wärme, UV-Strahlung, Plasma, Gamma-Strahlung, ...) und chemische (z. B.: Formaldehyd) Inaktivierungsverfahren [Steinbüchel].

#### *Wärmeinaktivierung*

Die Wärmesterilisation wird sehr vielseitig eingesetzt: Beim sterilen Arbeiten in mikrobiologischen Laboren werden Arbeitsgeräte wie Impfösen durch Ausglühen des Drahts am Bunsenbrenner sterilisiert. Werkzeuge aus Glas, die sich nicht glühend erhitzen lassen, werden durch mehrmaliges Abflammen von 98%-igem Alkohol auf der Oberfläche des Geräts, sterilisiert. Andere Geräte, die thermisch nicht labil sind, können mittels Dampfsterilisation im Autoklav (Wasserdampf bei einem Druck von 2 bar und einer Temperatur von 121 °C) in einen sterilen Zustand überführt werden.

Ein Inaktivierungsprozess prokaryontischer Keime durch Wärmeeinwirkung beinhaltet das Aufkochen einer Zellsuspension über einen gewissen Zeitraum. Durch die Wärmeeinwirkung denaturieren Proteine auf der Zelloberfläche sowie innerhalb der Mikroorganismen. Von diesen Schädigungen sind primär die Zytoplasmamembran, das Zytoplasma und die Zellwand betroffen.

Aufgrund des morphologischen Aufbaus von Bakterien ist der Inaktivierungsprozess stark zeitabhängig, da die einzelnen Zellbestandteile die Denaturierungstemperatur erreichen müssen. So werden z. B. Zellen mit dünnen Zellwänden schneller abgetötet als dickwandige [Bergmann, 1992; Steinbüchel, 2003].

Die dezimale Reduktionszeit (D-Wert) gibt dabei an, welche Zeit notwendig ist, um 90 % der Keime bei einer bestimmten Temperatur zu inaktivieren [Einschütz, 2004]. Für *Pseudomonaden* beträgt der D-Wert bei einer Temperatur von 73,3 °C 0,52 s [Kessler, 1988]. Bei hitzeresistenten Dauerformen wie Endosporenbildner ist ein wesentlich höherer D-Wert notwendig. So werden zum Beispiel 90 % Endosporen *Clostridium botulinum* mit einer Temperatur von 120 °C erst nach einer Einwirkzeit von 20 min inaktiviert [Einschütz, 2004].

#### *Chemische Inaktivierung mittels Formaldehyd*

Formaldehyd wird bei der Begasung von Räumen als Desinfektionsmittel und in der Immunlokalisation eingesetzt. Dabei werden Proteinstrukturen durch die so genannte Alkylierung verändert und eine Quervernetzung von Proteinen bewirkt. So werden unter anderem Hydroxymethylen-Brücken zwischen den basischen Aminosäuren der Proteine gebildet [Wintermantel, 2009; Luttmann, 2009].

#### *UV-Inaktivierung*

Die Desinfektion mit UV-Strahlung ist aufgrund ihrer geringen Eindringtiefe eine Oberflächensterilisationsmethode. Sie wird vorwiegend zur Sterilisation von Räumen und Kammern mit offenen und glatten Oberflächen eingesetzt. Zur Inaktivierung werden die Keime der direkten Strahlung im ultravioletten Bereich (unter 380 nm) ausgesetzt. Dabei treten UV-induzierte Schädigungen der DNA auf. Jedoch sind diese Schädigungen zellspezifisch, und einzelne Bakterienstämme, wie zum Beispiel *Deinococcus radiodurans*, weisen eine UV-Resistenz auf [Krisko, 2010].

### *$\gamma$ -Strahlung-Inaktivierung*

Die radioaktive Bestrahlung von Bakterien erzielt Radikalbildungen und beeinflusst damit Zellstoffwechselprozesse. Dabei werden besonders Nukleinsäuren geschädigt. Nukleinsäurebasen und Zucker werden von der  $\gamma$ -Strahlung zerstört, was zu Punktmutationen führen kann. Weiterhin werden Deletionen durch Phosphodiesterbindungen erzeugt. Die Nucleotidbasen besitzen unterschiedliche Strahlenresistenzen, wobei Thymin am strahlungsempfindlichsten ist [Czihak, 1990].

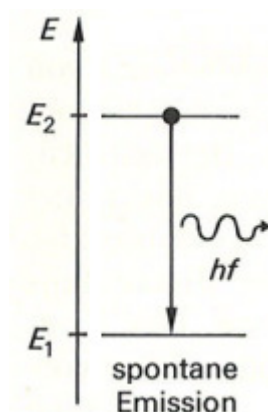
Prokaryontische Keime besitzen unterschiedliche Strahlungsresistenzen. So gibt es Keime wie zum Beispiel *Deinococcus radiodurans* welche als strahlungsresistent gelten und nur mit sehr hohen Strahlungsenergien von über 7 kGy inaktiviert werden können [Krisko, 2010].

### 1. 2. 2. Zellbiologische Wirkungen des Plasmas

Während der Plasmagenerierung wird Strahlung im ultravioletten Bereich, Ozon und eine Teilchenstrahlung erzeugt. Diese Plasmaresultate wirken je nach entstehender Menge und Energie zellschädigend.

### *UV-Strahlung*

Die Entstehung optischer Strahlung innerhalb des Plasmaprozesses lässt sich auf die An- und Abregung der einzelnen Moleküle zurückführen. Durch Stoßprozesse mit anderen Plasmateilchen werden die Atome bzw. Moleküle angeregt.



**Abbildung 2: Elektronen und Photonen wechselwirken innerhalb eines Atoms [Herning, 2002]**

Während dem Plasmaprozess werden Atome und Moleküle angeregt. Dabei werden Elektronen in höhere Energiezustände gehoben. Bei Abregung der Moleküle und dem Übergang eines Elektrons in den niedrigeren Energiezustand wird ein Photon mit der Energie  $E_2 - E_1 = \Delta E = h \cdot f$  emittiert. Bei entsprechend hoher Energiedifferenz ( $> 3,26$  eV) wird ultraviolette Strahlung emittiert.

Beim Übergang eines angeregten Atoms oder Moleküls in einen energetisch geringeren Zustand wird abhängig vom Energieübergang ein Photon mit folgender Energie emittiert:

$$E_2 - E_1 = \Delta E = h \cdot f$$

**Formel 8: Energieübergang**

mit	$E_2 - E_1 = \Delta E \dots$	Differenz der Energiezustände
	$h \dots$	Plancksches Wirkungsquantum
	$f \dots$	Frequenz

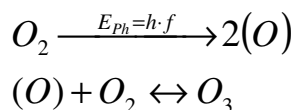
In Abhängigkeit der Atome kann auch UV-Strahlung emittiert werden. Als UV-Strahlung wird der Wellenlängenbereich von 10 bis 380 nm bezeichnet. UV-Strahlung wird in drei Bereiche untergliedert: UVA-Strahlung: 380 bis 315 nm, UVB-Strahlung: 315 bis 280 nm und UVC-Strahlung: 280 bis 10 nm [Bergmann, 1992].

Die UV-Strahlung wird von der DNA absorbiert. Die Basen der DNA beeinflussen die Absorption zwischen 200 und 260 nm. Bei einer Wellenlänge von weniger als 200 nm absorbiert das Desoxyribosephosphat des DNA-Rückgrats. UV-induzierte Schädigungen der DNA sind Basenschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüche und DNA-Proteinquervernetzungen. Die Basenschädigungen sind abhängig von der Wellenlänge der Strahlung und der Base selbst. Dabei wird die Base in ihrem Aufbau modifiziert. Die Einzelstrangbrüche werden auf die Absorption oder auf indirekte Schädigung der DNA durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt. Doppelstrangbrüche der Nukleotidketten entstehen bei UVC-Bestrahlung.

Das Erbgut der Zelle wird massiv geschädigt. Dadurch kann sich die Zelle nur noch fehlerbehaftet replizieren, oder sie ist generell nicht mehr in der Lage, sich zu teilen. In einem Wellenlängenbereich um 254 nm werden die wirkungsvollsten Schäden verursacht [Hellweg, 2001; Pfützner, 2003].

### *Ozon*

Ozon entsteht während des Plasmaprozesses, wenn eine UV-Strahlung  $< 242$  nm gegeben ist und Sauerstoff im Prozessgas enthalten ist, nach folgender Reaktionsgleichung:



**Formel 9: Ozongenerierung [Reinelt, 2008]**

Die notwendige Energie  $E_{ph} = h \cdot f$ , um ein Molekül aufzuspalten, bestimmt sich aus der Bindungsenthalpie, welche 498 kJ / mol für das  $O_2$ -Molekül beträgt [Holleman, 1995].

$$E_{ph} = h \cdot f; \quad E_{ph} = \frac{E_B}{N_A}; \quad c = \lambda \cdot f \Rightarrow f = \frac{c}{\lambda}$$

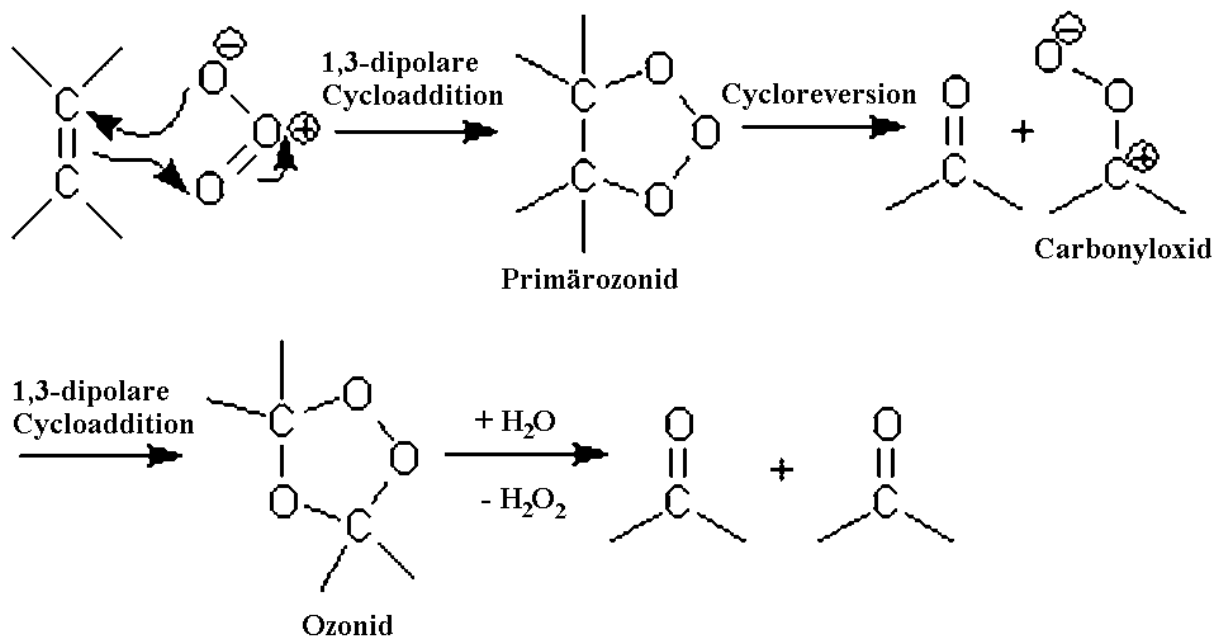
$$h \cdot \frac{c}{\lambda} = \frac{E_B}{N_A} \Rightarrow \lambda = \frac{h \cdot c \cdot N_A}{E_B}$$

$$\lambda = \frac{6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js} \cdot 2,998 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}}{498000 \frac{\text{J}}{\text{mol}}} = 2,402 \cdot 10^{-7} \text{ m} = 240,2 \text{ nm}$$

**Formel 10: Berechnung der Wellenlänge zur Aufspaltung eines O<sub>2</sub>-Moleküls [Holleman]**

mit... E<sub>B</sub>... Bindungsenthalpie  
 N<sub>A</sub>... Avogadro-Konstante  
 c... Lichtgeschwindigkeit im Vakuum

Die toxische Eigenschaft von Ozon kann auf die Ozonolyse (siehe Abbildung 3) zurückgeführt werden.

**Abbildung 3: Ozonolyse [Reinelt, 2008]**

Unter Ozoneinwirkung werden Kohlenstoffdoppelbindungen gespalten. Dabei können freie Radikale, Aldehyde, Ketone und Carbonsäuren gebildet werden.

In der Ozonolyse werden durch das Ozon Kohlenstoffdoppelbindungen gespalten und freie Radikale sowie Aldehyde, Ketone und Carbonsäuren gebildet. Als Radikale werden Moleküle bzw. Molekülbruchstücke mit ungepaarten Elektronen bezeichnet. Diese Radikale beeinflussen chemische Reaktionen innerhalb der Zelle. Dabei werden schwerwiegende DNA-Schädigungen hervorgerufen [Reinelt, 2008].

Für den Menschen riechbar wird das Ozongas bei einer Konzentration von 40 µg / m<sup>3</sup>. Bei einer Konzentration von weniger als 110 µg / m<sup>3</sup> ist das Ozon für den Menschen ungefährlich. Eine Ozonkonzentration von mehr als 360 µg / m<sup>3</sup> gilt als gesundheitsschädlich [mb-systemtechnik, 2012].

Bei Versuchen mit der Zelllinie L929 wurde nachgewiesen, dass bei einer 30 min - Ozonbehandlung mit einer Konzentration von  $500 \mu\text{g} / \text{m}^3$  DNA-Strangbrüche, Membranschäden und Enzyminaktivierungen induziert werden [Reinelt, 2008]

### Teilchenstrahlung

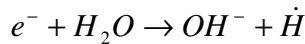
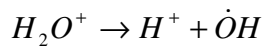
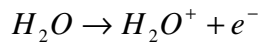
Die Teilchenstrahlung entsteht durch unterschiedliche Reaktionen der Moleküle und Atome im Plasma. Dabei werden Elektronen aus der Atomhülle herausgeschlagen. Ionen und Elektronen liegen als freie Ladungsträger vor [Bergmann, 1992]. Mögliche Reaktionen mit Ladungsträgern sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Übersicht Reaktionen im Plasma[Hollahan, 1974]**

Reaktionen von Elektronen		
Ionisierung	$e^- + X \rightarrow X^+ + 2e^-$	
	$e^- + (X - X) \rightarrow (X - X)^+ + 2e^-$	
Dissoziation	$e^- + (X - X) \rightarrow X^+ + X + 2e^-$	
	$e^- + (X - X) \rightarrow 2X + e^-$	
Anlagerung	$e^- + X \rightarrow X^-$	
	$e^- + (X - X) \rightarrow (X - X)^-$	
Rekombination	$e^- + X^+ \rightarrow X$	
	$e^- + (X - X)^+ \rightarrow (X - X)$	
Reaktionen von Ionen und Atomen		
Ladungsübertragung	$X^+ + (X - X) \rightarrow (X - X)^+ + X$	
	$X^- + (X - X) \rightarrow (X - X)^- + X$	
Ablösung	$X^- + X \rightarrow (X - X) + e^-$	
	$X^- + (X - X) \rightarrow (X - X) + X + e^-$	
Ion-Ion Rekombination	$X^- + X^+ \rightarrow (X - X)$	
	$X^- + (X - X)^+ \rightarrow (X - X) + X$	
Atom Rekombination	$2X \rightarrow (X - X)$	
	$3X \rightarrow X + (X - X)$	

Elektronen können bei entsprechend hoher Energie tief in die Zelle eindringen. Das Eindringvermögen von Ionen ist abhängig von der Energie des Ions. Stark beschleunigte Ionen können Zellmembranen durchschlagen und starke Schäden innerhalb der Zelle hervorrufen [Hering, 2002].

Ionisierende Strahlung verändern und zerstören Bindungen in Molekülen. Dabei entstehen freie Radikale und Moleküle. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Radiolyse von Wasser:



**Formel 11: Radiolyse von Wasser [Czihak, 1990]**

Die bei der Radiolyse entstehenden Hydroxylradikale und die Änderung des pH-Wertes schädigen den Stoffwechsel der Zelle und führen zu Schädigungen der Nukleinsäuren und somit der DNA [Czihak, 1990].

### 1. 2. 3. *Pseudomonas fluorescens*

Für die mikrobiologischen Versuche wurde *Pseudomona fluorescens* eingesetzt. Diese werden systematisch wie folgt eingeordnet:

Domäne: Bakterien  
Abteilung: Proteobacteria  
Klasse: Gammaproteobacteria  
Ordnung: Pseudomonadales  
Familie: Pseudomonadaceae  
Gattung: *Pseudomonas*  
Art: *Pseudomonas fluorescens*

[Murray, 2007]

#### *Pseudomonaden*

*Pseudomonaden* sind aerobe gramnegative Bakterien, die nicht zur Sporenbildung befähigt sind. Die Morphologie ist stäbchenförmig, wobei ein Größenspektrum von 0,5 bis 1 µm in der Breite und 1,5 bis 5 µm in der Länge auftritt. *Pseudomonaden* bewegen sich aktiv mittels mehrerer polarer Geißeln.

In der Natur sind *Pseudomonaden* in Flüssigkeiten wie Brackwasser verbreitet. Eine Vermehrung dieser Bakterienzellen ist in einem Temperaturbereich von 4 bis 36 °C möglich.

Als Krankheitserreger treten sie in erster Linie bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem auf. Dabei können sie Entzündungen (z.B. Lungenentzündung) und Infektionen (z.B. Harnweg- oder Wundinfektionen) bis hin zu Herzerkrankungen und Sepsis hervorrufen [Murray, 2007].

#### *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* wurden in den mikrobiologischen Versuchen aufgrund ihrer einfachen Kultivierbarkeit als Modellbakterium verwendet. Diese Spezies scheidet das fluoreszierende Pigment Fluorescein aus, welches durch Magnesiumsulfat aktiviert wird. Das Fluorescein wird mit einer Wellenlänge von 366 nm angeregt und emittiert von 500 bis 530 nm.



Weiterhin eignete sich *Pseudomonas fluorescens* als Modellbakterium aufgrund seiner geringen Einstufung innerhalb der Risikogruppen [dsmz, 2012]. *Pseudomonas fluorescens* gehören der Risikogruppe 1 an, somit ist ein Arbeiten mit gewöhnlichen Hygienemaßnahmen, wie zum Beispiel Händedesinfektion, erforderlich. Jedoch besteht keine Gefährdung für den Anwender.

## 2. Zielstellung und technisches Konzept

Ziel der vorliegenden Masterarbeit war die Untersuchung des Einflusses einer systematischen Atmosphärendruckplasmabehandlung prokaryontischer Keime. Als biologisches Untersuchungsobjekt kamen hierbei *Pseudomonaden* der Art *Pseudomonas fluorescens* zur Anwendung. Besonderes Augenmerk lag dabei zum einen auf der Charakterisierung des Plasmagenerators und zum anderen auf der biologischen Anwendung desselben.

Physikalisch wurde das für die biologischen Versuche genutzte Plasma in Bezug auf das emittierte optische Spektrum, die Entstehung von Ozon und die auftretende Teilchenstrahlung charakterisiert. Das optische Spektrum wurde mit einem Faserspektrometer untersucht. Der Ozongehalt wurde mittels eines Ozonmessgeräts bestimmt. Die ionisierten Teilchen wurden anhand der emittierenden Wellenlängen im optischen Spektrum detektiert und charakterisiert.

Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse wurden in Erweiterung auf ihre biologische Wirkung am Modellorganismus untersucht. Dabei wurden die Plasmaparameter Aktivgas (Sauerstoff, Stickstoff und Argon), Gasfluss, Bestrahlungszeit und elektrische Spannung variiert.

Das Ziel hierbei war die Entwicklung einer Parameterkombination, welche zu einer Abtötung der Bakterien führt, jedoch etwaige immunogene Strukturen, wie Proteine, unbeeinträchtigt läßt.

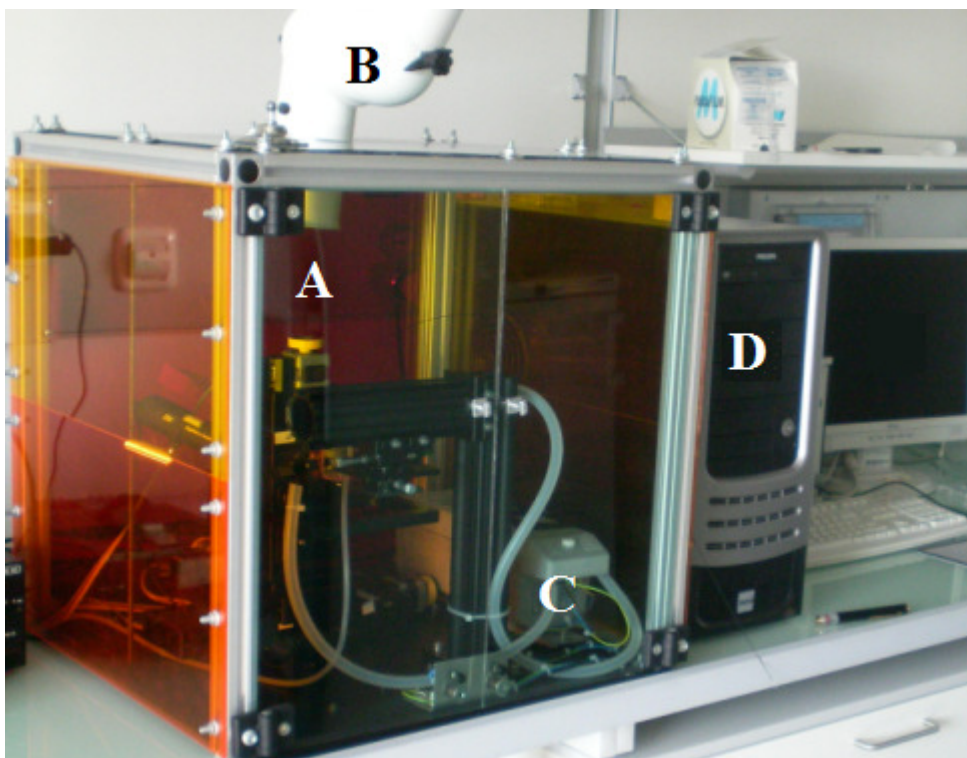
In der vorliegenden Arbeit wurde eine Versuchsdurchführung entwickelt, in der als Resultat eine behandelte Bakteriensuspension vorliegt, mit welcher weitere Versuche bezüglich der Proteinuntersuchungen erfolgen können. Die Mikroorganismen sollen dabei inaktiviert bzw. nicht mehr vermehrungsfähig sein. Über diese Arbeit hinaus werden anschließend die Proteine der inaktivierten Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Funktionsfähigkeit untersucht. Ziel ist die Funktionsfähigkeit der Proteine zu erhalten, jedoch die Vermehrungsfähigkeit zu hemmen, um mit diesen inaktivierten Bakterien Tiere zu immunisieren und Antikörper zu gewinnen.

### 3. Material und Methoden

Das Kapitel Material & Methoden bezieht sich auf den Aufbau des Plasmagenerators und dessen Charakterisierung. Des Weiteren wird die Kultivierung der *Pseudomonas fluorescens* und deren Bestrahlung erläutert.

#### 3.1. Aufbau des Plasmagenerators

Der Plasmagenerator besteht aus dem Plasmakopf und der Spannungsversorgung sowie dem verfahrbaren Probenstisch. Wie auf der Abbildung 4 zu erkennen ist, befinden sich der Plasmakopf und der verfahrbare Probenstisch in einer Einhausung. Die zum Aufbau eingesetzten Materialien sind im Anhang unter Tabelle A 1 aufgelistet.



**Abbildung 4: Fotografie des Plasmagenerator-Aufbaus im Labor**

Mit den Buchstaben A bis D wurden die Einhausung (A), der Abzug (B), der Transformator (C) und die Rechneinheit (D) markiert.

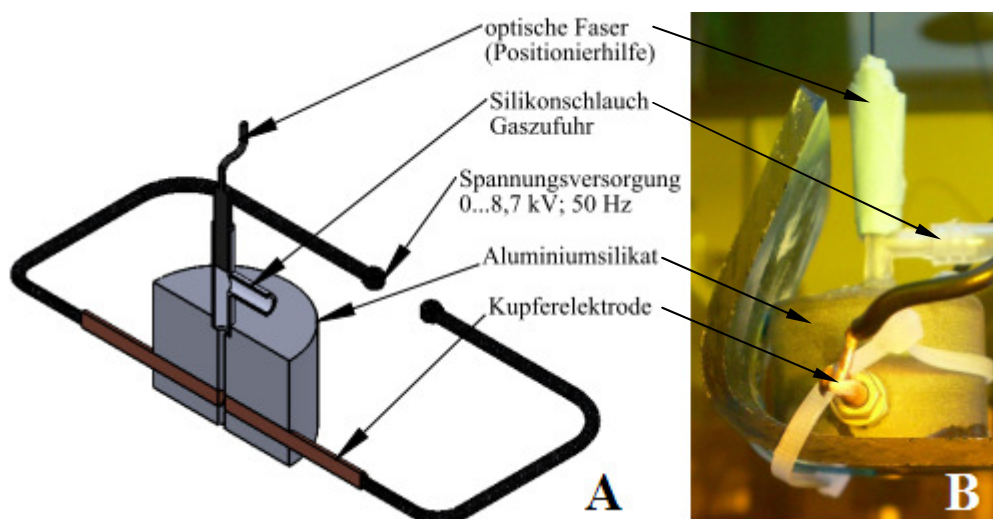
- |  |  |
|--|--|
| (A) – Einhausung des Plasmagenerators: | Innerhalb dieser Einhausung befinden sich der Plasmakopf, der Probenstisch mit Schrittmotoren und der Transformator (C). Die Einhausung ist notwendig um den Anwender vor dem entstehenden Ozon zu schützen. |
| (B) – Abzug:                           | Da während der Plasmagenerierung Ozon entsteht wird das schädliche Gas über diesen Abzug abgesaugt.  |
| (C) – Transformator:                   | Mittels dieses Transformators wird die Primärspannung (0 bis 200 V) auf bis zu 8 kV transformiert.   |
| (D)- Rechneinheit:                     | Die Positionierung des Probenstisches erfolgt über Schrittmotoren. Diese werden mit der Rechneinheit angesteuert.  |

Die Einhausung des Plasmakopfes ist notwendig, um den Anwender vor Ozon zu schützen. Das Ozon wird zusätzlich über einen Abzug abgesaugt. Des Weiteren ist eine Rechneinheit im System integriert, mit welcher die Schrittmotoren des Probentisches angesteuert werden. Somit kann die Probe unter dem Plasmakopf positioniert werden. Der hochspannungsführende Teil der Spannungsversorgung ist als Schutzmaßnahme ebenfalls in der Einhausung integriert. Der Transformator, welcher die Primärspannung des Schaltstelltransformators auf bis zu 8 kV umwandelt, befindet sich innerhalb der Einhausung. Weiterhin wurden alle hochspannungsführenden Stromkabel mit Silikonschläuchen als zusätzlicher Schutz ummantelt.

Eine weitere Sicherheitsmaßnahme bezieht sich auf das Öffnen der Türen der Einhausung. Diese sind so gesichert, dass beim Öffnen der Stromkreislauf unterbrochen wird um Gefahren durch die hohen Spannungen zu vermeiden.

### *Plasmakopf*

Die für den Aufbau des Plasmakopfes verwendeten Materialien wurden unter Tabelle A 2 aufgelistet.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung (A) und Fotografie (B) des Plasmakopfes**

Der Grundkörper des Plasmakopfes besteht aus Aluminiumsilikat, und in dessen Mitte befindet sich eine Bohrung. Seitlich zu dieser Bohrung sind zwei weitere Bohrungen angebracht in denen die Kupferelektroden integriert wurden. Von oben wird durch die mittige Bohrung die Gaszufuhr gewährleistet. Eine optische Faser wird senkrecht obenauf mittels des Silikonschlauchadapters positioniert. Über die Kupferelektroden wird eine Spannung mit 0 bis 8 kV und 50 Hz angelegt.

In der Abbildung 5A ist eine schematische Darstellung des Plasmakopfes gezeigt. Der Grundkörper besteht aus Aluminiumsilikat. Dieser Werkstoff wurde für den Grundkörper eingesetzt, da das Material gegenüber Chemikalien weitestgehend inert und thermisch stabil ist. In der Mitte des Grundkörpers befindet sich eine Bohrung mit 1,5 mm Innendurchmesser. Seitlich zu dieser Bohrung sind zwei weitere Bohrungen (Innendurchmesser: 3 mm) angebracht in die die Kupferelektroden integriert

wurden. In die 1,5 mm Bohrung wird von oben die Gaszufuhr mittels eines Silikonschlauchadapters gewährleistet [Grießner, 2011]. Über den Gasfluss werden die geladenen Gasteilchen aus dem Grundkörper herausgedrückt. Als Trägergas wurde in den Versuchen Argon, Stickstoff oder Sauerstoff mit einem Druck zwischen 0,1 bis 1 bar eingesetzt.

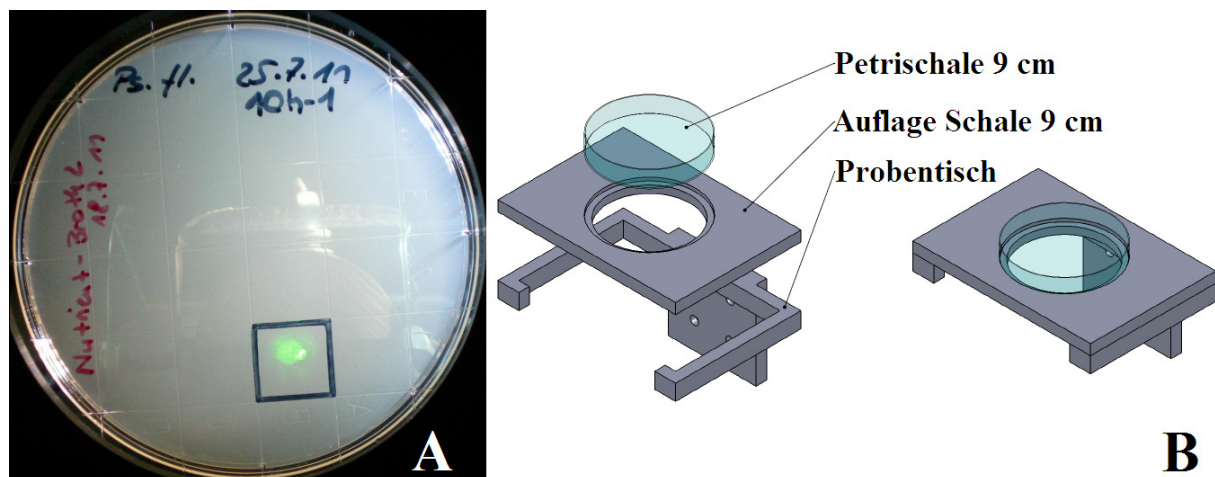
Die direkt über die Kupferelektroden angelegte Spannung ist eine Wechselspannung mit 50 Hz und kann mit einem Schaltstelltransformator zwischen 0 und 8 kV geregelt werden.

Die Abbildung 5B zeigt eine seitliche Fotografie des Plasmakopfs. Zu erkennen sind der Grundkörper aus Aluminiumsilikat, eine Kupferelektrode sowie der Silikonschlauchadapter über welchen die Gaszufuhr gegeben ist und die optische Faser senkrecht positioniert wird.

### Positionierhilfe

Der bisher beschriebene Plasmagenerator wurde für die Untersuchung von Plasmabeeinflussungen auf die Oberfläche eines Objektträgers eingesetzt. Zur Anwendung auf biologisches Material wurde das System mit einer Positionierhilfe erweitert. Dazu wurden die unter Tabelle A 3 aufgelisteten Komponenten eingesetzt.

Mithilfe eines Laserpointers und einer optischen Faser wurde durch den Aluminiumsilikat-Körper hindurch eine kreisförmige Fläche auf die Probe projiziert. Diese Fläche ist deckungsgleich mit dem Bestrahlungszentrum des Plasmas. Zur Kontrolle der Position wurde eine Kamera unterhalb des Probenstisches angebracht.



**Abbildung 6: Positionierung der Probe**

Im Bild A ist eine Aufnahme mit der Kamera einer Probe (Agarplatte) während der Positionierung dargestellt. In dem eingerahmten Quadrat ist ein grüner Punkt zu sehen, welcher das Bestrahlungszentrum darstellt. Das Bild B beinhaltet die Konstruktion des Probenstisches. Ziel dieser neuen Konstruktion ist die Möglichkeit, die Probenplatte mit einer Kamera von unten zu betrachten und in ihrer Positionierung zu kontrollieren und zu korrigieren.

Des Weiteren wurden neue Probenstische nach Konstruktion (siehe Abbildung 6) gefräst, um die Proben so zu halten, dass die optische Strahlung des Laserpointers von unterhalb der Probe detektiert

werden kann. Die Tischauflagen sind wechselbar. Somit können mit dem Probenstisch die folgende Formate nach Tabelle 2 eingesetzt werden:

**Tabelle 2: Formate welche für Probenstisch geeignet sind**

Format	Form	Maße
Petrischale	Kreis	3,5 cm
Petrischale	Kreis	6,5 cm
4er Zellkulturtestplatte	Quadrat	6,6 x 6,6 cm
96er / 12er / 24er Zellkulturtestplatte	Rechteck	12,8 cm x 8,5 cm

### Spannungsversorgung

Für die Spannungsversorgung eingesetzten Geräte und Bauteile sind unter Tabelle A 4 aufgelistet.

Der Schaltstelltransformator dient der Einstellung der Primärspannung zwischen 0 und 200 V. Diese Spannung wird mittels des Transformators verstärkt.

Die maximale Ausgangsspannung des Transformators beträgt 10 kV bei einer vom Hersteller angegebenen Primärspannung von 250 V. Dementsprechend berechnet sich der Übertragungsfaktor  $\gamma$ :

$$\gamma = \frac{U_1}{U_2} = \frac{250V}{10000V} = 0,025$$

### Formel 12: Berechnung Übertragungsfaktor

mit  $U_1$  ... Primärspannung  
 $U_2$  ... Sekundärspannung  
 $\gamma$  ... Übertragungsfaktor

Anhand des Übertragungsfaktors berechnet sich die maximale Sekundärspannung bei einer Primärspannung von 200 V:

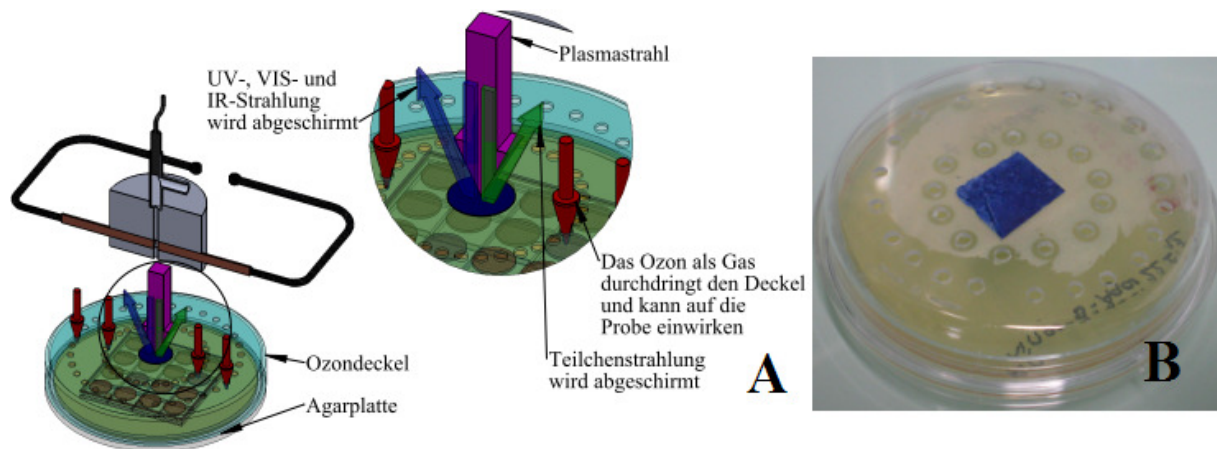
$$\frac{U_1}{U_2} = \gamma; \quad U_2 = \frac{U_1}{\gamma} = \frac{200V}{0,025} = 8000V = 8kV$$

Mit einer regelbaren Primärspannung zwischen 0 und 200 V ist die Sekundärspannung zwischen 0 und 8 kV ansteuerbar.

### Präparation des Ozondeckels

Um den Einfluss von Ozon zu prüfen, wurde in einem Bestrahlungsversuch von *Pseudomonas fluorescens* auf einer Kulturagaroberfläche der Deckel einer Abklatschplatte präpariert. Dazu wurden 35 Stück 2 mm große Löcher in den Deckel gebohrt und der Strahlengang der optischen Strahlung und der Teilchenstrahlung mittels eines Absorbers unterbrochen. Das während des Plasmaprozesses entstehende Ozon kann auf die Probe einwirken, die UV- Strahlung und die Teilchenstrahlung nehmen

keinen Einfluss auf die Probe. Eine schematische Darstellung und ein Foto des Ozondeckel-Prinzips sind in der Abbildung 7 gezeigt.



**Abbildung 7: Prinzip des Ozondeckels**

Der Ozondeckel ist ein Deckel der Abklatschplatte, welcher mit 2 mm großen Löchern und einem Absorber präpariert wurde.

Die Abbildung 7A beinhaltet eine schematische Darstellung des Funktionsprinzips. Die unter dem Deckel liegende Probe wird von der UV- und Teilchenstrahlung abgeschirmt. Das im Plasmaprozess generierte Ozon dringt durch den perforierten Deckel und wirkt auf die Probe ein.

In der Abbildung 7B ist eine Fotografie des Ozondeckels zu sehen. Zu erkennen sind die Bohrungen und der Absorber zur Abschirmung der Strahlung. Unter dem Deckel befindet sich eine mit Agar gefüllte Abklatschplatte.

### 3. 2. Charakterisierung der Plasmaflamme

Im folgenden Abschnitt wird die Vorgehensweise für die Untersuchung der einzelnen Plasmaparameter beschrieben. Diese genaue Analyse ist notwendig, um Rückschlüsse auf den Einfluss der einzelnen Faktoren auf die Inaktivierung der Bakterien zu ziehen.

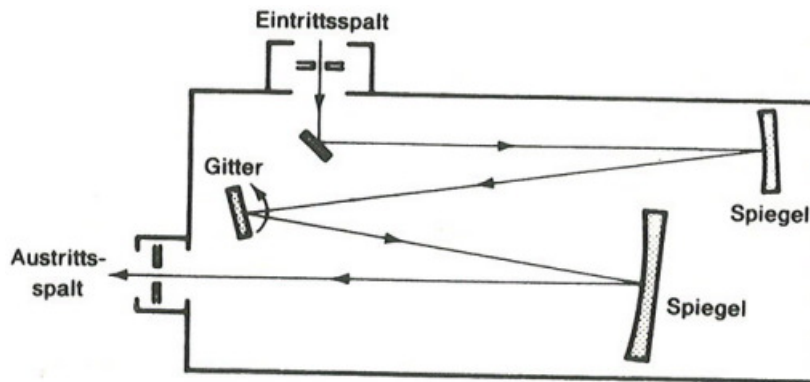
#### 3. 2. 1. Optisches Spektrum

Das optische Spektrum einer Plasmaflamme gibt Rückschlüsse auf die ionisierten Gase. Von besonderem Interesse ist die optische Strahlung im ultravioletten Bereich, da diese zellschädigend wirkt. Bei einer Wellenlänge von weniger als 242 nm wird Ozon gebildet.



### Messprinzip

Die Messung erfolgte mit dem Faserspektrometer AVA SPEC 3648 der Firma Avantes. Dieses funktioniert nach dem Czerny-Turner-Prinzip.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Czerny-Turner-Spektrometers [Pedrotti, 2002]**

Das System nach Czerny-Turner besteht aus zwei Spiegeln, einem beweglichen Gitter, einem Eintritts- und Austrittsspalt.

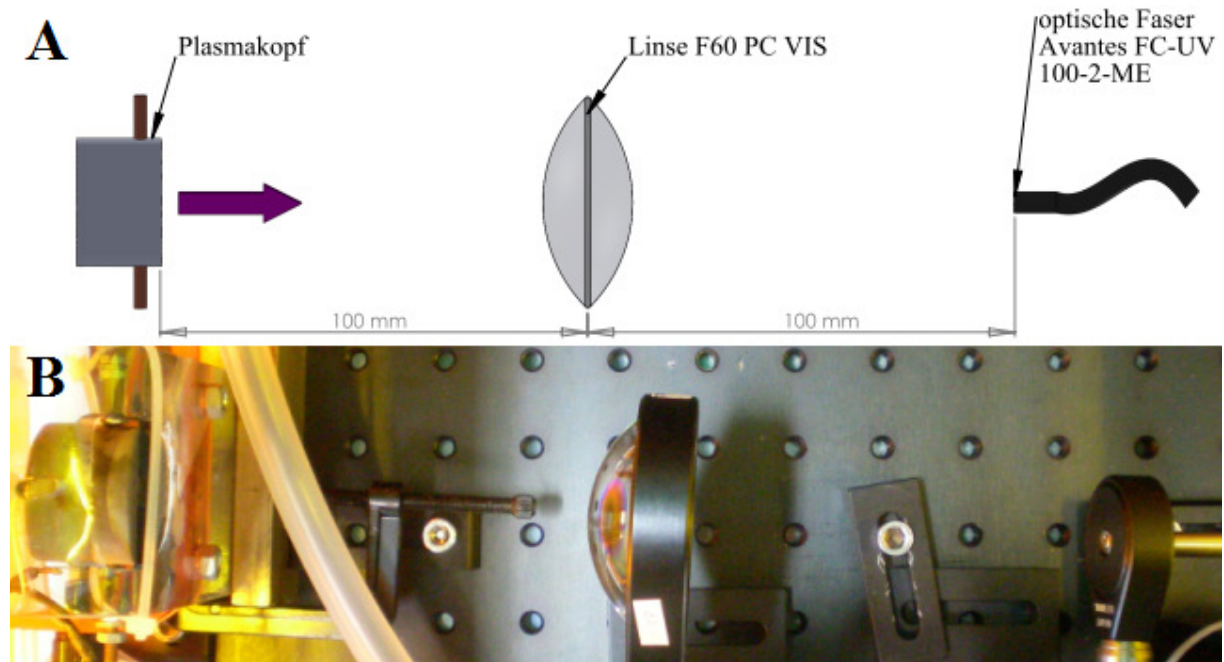
In der Abbildung 8 ist das Spektrometerprinzip nach Czerny-Turner dargestellt. Aus dem Eintrittsspalt wird der optische Strahl auf den ersten Spiegel gelenkt. Dieser ist konvex und erzeugt einen parallelen Strahl auf das Gitter. Vom Gitter aus trifft der Strahl auf den zweiten Spiegel und wird auf den Ausgangsspalt gelenkt. Dreht man das Gitter, so wird das optische Spektrum über den Ausgangsspalt bewegt. [Pedrotti, 2002]

Am Ausgangsspalt ist eine 3648 Pixel-CCD-Zeile angebracht, welche die Intensitäten der einzelnen Wellenlängen detektiert.

### Messaufbau

Das optische Spektrum des Plasmakopfes wurde mittels des Faserspektrometers AVA SPEC 3648 aufgenommen. Dazu wurde die optische Strahlung mit einer Sammellinse mit einer Brennweite von 60 mm auf die optische Faser fokussiert.



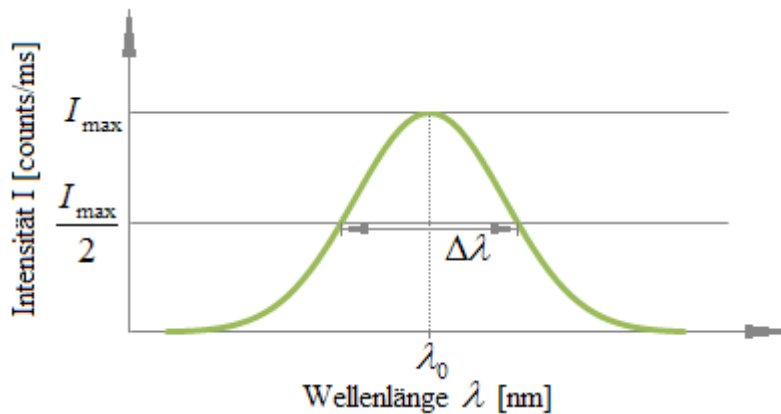


**Abbildung 9: Messaufbau zur Aufnahme des optischen Spektrums**

Plasmakopf, Linse und optische Faser stehen jeweils im Abstand von 10 cm zueinander. Die optische Strahlung wird mit der Linse auf die optische Faser fokussiert.

Die Intensitäten der einzelnen Wellenlängen wurde in counts / ms gemessen. Um die optischen Spektren der Aktivgase mit einander zu vergleichen wurde zunächst das Spektrum der einzelnen Gase bei einem konstanten Gasdruck von 0,2 bar und einer konstanten Primärspannung von 100 V aufgenommen. In weiterführenden Versuchen wurde die Intensitätsabhängigkeit von der Primärspannung bei einem konstanten Gasdruck von 0,2 bar gemessen. Des Weiteren wurde die Intensitätsänderung bei Variation des Gasdruckes mit einer konstanten Primärspannung von 200 V untersucht.

Die Messdaten wurden graphisch als Intensität in counts / ms in Abhängigkeit von der Wellenlänge in nm dargestellt. Die einzelnen Peaks wurden bestimmt und mit der maximale Intensität ( $I_{\max}$ ), der zentrale Wellenlänge ( $\lambda_0$ ) und der Halbwertsbreite ( $\Delta\lambda$ ) (siehe Abbildung 10) in der Tabelle A 7 bis Tabelle A 9 angegeben.



**Abbildung 10: Linienprofil einer Spektrallinie**

Jeder Peak besitzt eine maximale Intensität ( $I_{\max}$ ) bei der zentralen Wellenlänge ( $\lambda_0$ ). Die Halbwertsbreite ( $\Delta\lambda$ ) bestimmt sich aus der Linienbreite bei der halben maximalen Intensität  $\frac{I_{\max}}{2}$ .

### 3. 2. 2. Ozongehalt

Der Ozongehalt wurde mit dem Ozonmessgerät O3 M 200 der Firma MB Systemtechnik bestimmt. Dabei handelt es sich um einen elektrochemischen Gassensor welcher mit einer Genauigkeit von 10 ppb im Messbereich von 10 bis 1000 ppb den Ozongehalt bestimmt. 1 ppb entspricht einem Ozongehalt von  $2,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  [mb-systemtechnik, 2012].

Der elektrochemische Sensor wurde direkt im Strahlengang des Plasmagenerators mit einem Abstand zum Plasmakopf von 5 mm positioniert. Die Laborabsauganlage war während der Versuche zugeschaltet. Die Messung erfolgte 30 s nach Einschalten des Plasmagenerators. Die Bestimmung der Ozonkonzentration wurde für die Aktivgase Argon, Stickstoff und Sauerstoff durchgeführt. Des Weiteren wurde der Einfluss der Spannung anhand der Variation der Primärspannung zwischen 100 und 200 V untersucht.

### 3. 2. 3. Teilchenstrahlung

Die Charakterisierung der Teilchenstrahlung erfolgte anhand der unter „III. 2. 1. Optisches Spektrum“ erzielten Ergebnisse. Die im optischen Spektrum gemessenen Wellenlängen geben Informationen zu den angeregten und geladenen Atomen und Molekülen. Jedes angeregte Atom und Molekül besitzt ein charakteristisches Emissionsspektrum.

Anhand der detektierten Wellenlängen wurden aus der Datenbank [NIST, 2012] die angeregten Ionen mit der Elektronenkonfiguration und Energieübergänge aufgezeigt.

### 3. 3. Kultivierung von *Pseudomonas fluorescens*

#### *Chemikalien*

Die verwendeten Bakterien *Pseudomonas fluorescens* wurden in Nutrient-Broth No.2-Medium kultiviert. Als Kulturagar wurde Kings-B-Agar (Basis) und Nutrient-Broth No.2-Agar verwendet. Die für die Herstellung der Medien und Kulturagar eingesetzten Chemikalien sind im Anhang unter Tabelle A 5 aufgelistet. Die in Tabelle A 6 aufgelisteten Geräte wurden zur Zellkultivierung eingesetzt.

#### *Herstellung 1 l Kulturmedium Nutrient-Broth No.2*

Chemikalien:                -        15 g Nutrient Broth No.2  
                                     -        1 l destilliertes Wasser

Zur Herstellung des Kulturmediums wurden 15 g Nutrient Broth No.2 in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde das Medium autoklaviert um, Keimfreiheit zu garantieren. Die Lagerung des Mediums erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

#### *Herstellung 250 ml Nutrient-Broth No.2-Agar*

Chemikalien:                -        3,75 g Agar-Agar  
                                     -        3,75 g Nutrient Broth No.2  
                                     -        250 ml destilliertes Wasser

Zur Herstellung des Kulturagars wurden 3,75 g Agar-Agar und 3,75 g Nutrient Broth No.2 in 250 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der Agar autoklaviert. Zum Gießen der Agarplatten wurde der Agar auf 50 bis 80 °C erwärmt. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

#### *Herstellung 250 ml King's B-Agar*

Chemikalien:                -        9,225 g King's B-Agar (Basis) nach EN 12780  
                                     -        2,5 ml Glycerol  
                                     -        250 ml destilliertes Wasser

Zur Herstellung des Kulturagars wurden 9,225 g King's B-Agar (Basis) in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde 2,5 ml Glycerol dazugegeben und unter Hitze gelöst. Anschließend wurde

der Agar autoklaviert. Zum Gießen der Agarplatten wurde der Agar auf 50 bis 80 °C erwärmt. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

#### Anzucht von *Pseudomonas fluorescens*

Die *Pseudomonas fluorescens* (DSM-Nr.: 50090) wurden als gefriergetrocknetes Pellet in einer Ampulle (siehe Abbildung 11) vom Leibniz-Institut DSMZ bezogen.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aufbewahrung der gefriergetrockneten Ampulle [dsmz, 2012]**

Die Ampulle besteht aus einem äußeren und inneren Röhrchen aus Glas. Das gefriergetrocknete Bakterienpellet befindet sich in dem inneren Röhrchen und ist in Baumwolle gebettet. Unterhalb des Pellet befindet sich Silicagel als Feuchtigkeitsindikator.

Mittels eines Glaskratzers und Hitzeeinwirkung wurde das äußere Röhrchen geöffnet. Das innere Röhrchen wurde entnommen und der darin befindliche Baumwollstopfen entfernt. Anschließend wurden 500 µl Nutrient-Broth No.2-Medium auf das Zellpellet gegeben und das Röhrchen mit dem Baumwollstopfen wieder verschlossen. In einer Wartezeit von 30 min quillt das Pellet in dem Medium auf. Dann wurde der Inhalt des Röhrchens mittels einer Pipette gut durchmischt und in ein mit 5 ml Nutrient-Broth No.2-Medium gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Inkubation wurde das Medium mit dem gelösten Zellpellet im Inkubationsschüttler bei 160 rpm und 30 °C über Nacht inkubiert. Darüber hinaus wurde eine Nutrient-Broth No.2-Agarplatte mit 20 µl des beimpften Mediums inkubiert.

#### Anzucht Bakteriensuspension

Zur Anzucht einer Bakteriensuspension wurden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen 10 µl Bakteriensuspension aus dem DMSO-Stock in 10 ml Nutrient-Broth2-Medium gegeben. Anschließend wurde die Kultur über Nacht auf dem Schüttler bei 160 rpm und 30 °C inkubiert.

### Herstellung *Pseudomonas fluorescens*-Bakterienstock in DMSO

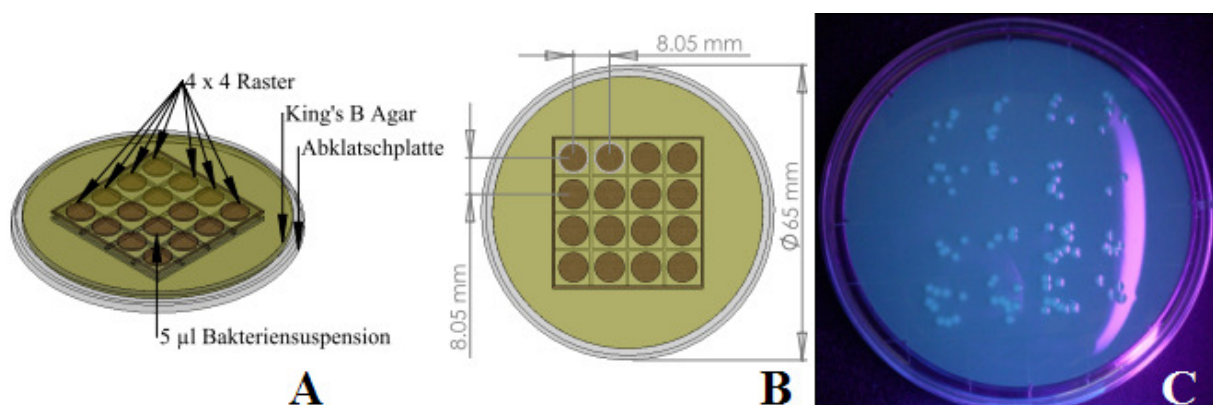
Zur Kryokonservierung der *Pseudomonas fluorescens* wurden DMSO-Stocks hergestellt. Dazu wurde zunächst eine Bakteriensuspension mit einem Extinktionskoeffizienten von 0,6 hergestellt. Die auch als optische Dichte bezeichnete Extinktion gibt Auskunft über die Bakteriendichte in der Zellsuspension. Eine optische Dichte von 0,64 entspricht einer Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^{10}$  Zellen/ml bei *Pseudomonaden* [bionumbers, 2012]. Die Kontrolle der Extinktion erfolgte mit einem Biophotometer mit einer Wellenlänge von 600 nm. Die Bakteriensuspension wurde bei 1000 g, 5 min zentrifugiert. Der Medienüberstand wurde verworfen und das Zellpellet in 900 µl frischem Medium resuspendiert. 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde als Gefrierschutzmittel zugeführt und die Bakteriensuspension in Kryo-Tubes überführt. Diese wurden in einer Styroporbox schonend bei -80 °C eingefroren.

### 3. 4. Bestrahlung von *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* wurde auf Kulturagar, in Zellsuspension und auf Filterpapier bestrahlt.

#### 3. 4. 1. Bestrahlung von *Pseudomonas fluorescens* auf einer Kulturagaroberfläche

Zunächst wurde *Pseudomonas fluorescens* in einer Schüttelkultur über Nacht bis zu einer optischen Dichte von 0,14 bzw. 0,36 inkubiert und anschließend 50 µl Bakteriensuspension mit einer Verdünnung von 1 : 25000 bzw. 1 : 50000 in 4 x 4 5 µl-Tropfen (mittels Mehrkanalpipette) auf den Agar aufgetragen.

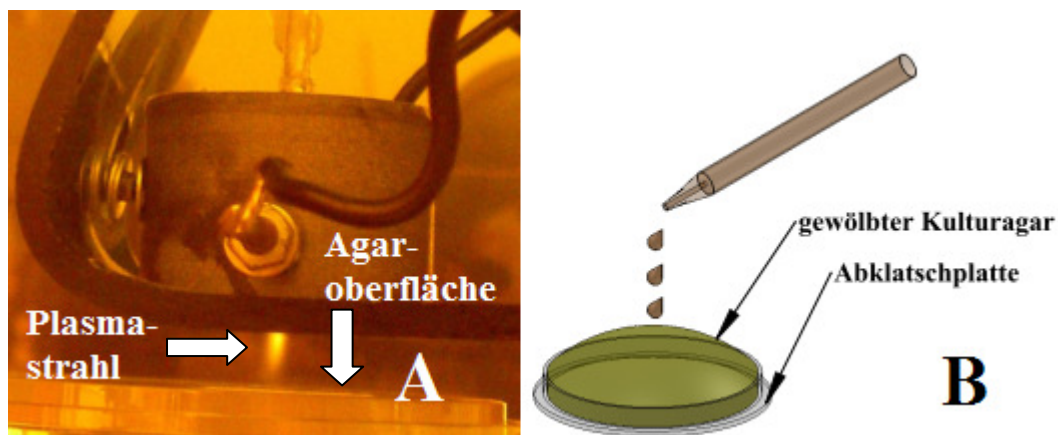


**Abbildung 12: Schematische Darstellung und Fotografie des 4 x 4-Rastermusters auf den Agarplatten**

Zur systematischen und gleichmäßigen Beimpfung der Agarplatten wurde eine 4 x 4-Matrix aufgetragen. In der Abbildung A ist dieses Rasterprinzip schematisch verdeutlicht. Es wurden 4 x 4 5 µl-Spots Bakteriensuspension mittels einer Mehrkanalpipette gesetzt. Die Spotabstände betrugen 8,05 mm. Dies ist schematisch in Abbildung B dargestellt. Die Abbildung C zeigt eine Fotografie einer 24 h mit *Pseudomonas fluorescens* inkubierten King's B Agarplatte. Die Kolonieverteilung ist gleichmäßig und reproduzierbar, da pro Spot die gleiche Menge an Bakterien aufgetragen wurde.

In den Bestrahlungsversuchen auf Kulturagar wurde King's B-Agar (Basis) nach EN 12780 der Firma SIFIN verwendet. Dieser Agar enthält Magnesiumsulfat, welches die Produktion des Pigments Fluorescein anregt.

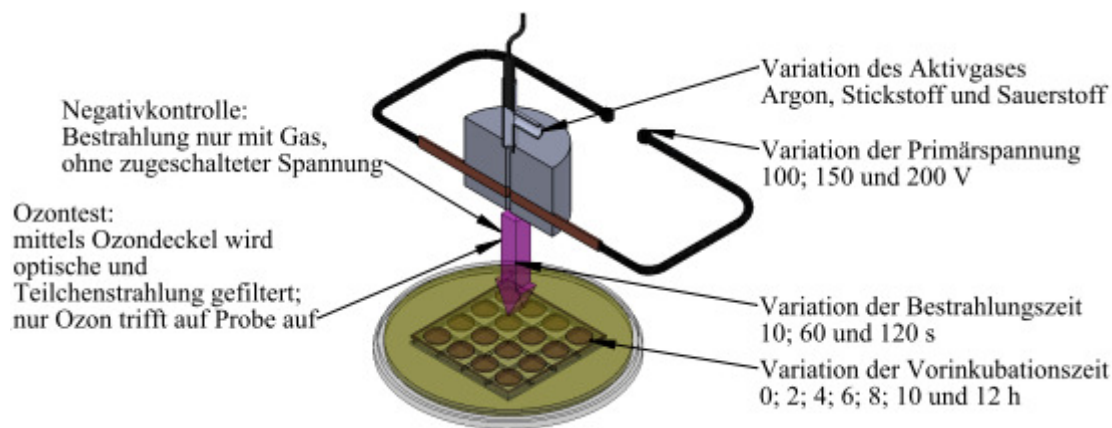
Um einen geringen Abstand zwischen der beimpften Agar-Oberfläche und dem Plasmakopf zu ermöglichen, wurden für die Bestrahlungsversuche Abklatschplatten verwendet. Diese Platten lassen sich mit einer konvexen Oberfläche herstellen. Die Bakterienkolonien befinden sich auf der Agar-Oberfläche und sind somit dem Plasmastrahl direkt ausgesetzt.



**Abbildung 13: Verringerung des Abstands zwischen Kulturagaroberfläche und Plasmaflamme durch Verwendung von Agarabklatschplatten**

Abbildung A beinhaltet eine Fotografie der Bestrahlung der Agaroberfläche. Der Plasmastrahl ist deutlich erkennbar und der Abstand zwischen Agaroberfläche und Plasmaquelle ist frei wählbar. Das Funktionsprinzip der gewölbten Oberfläche durch Gießen einer Abklatschplatte wird in Abbildung B verdeutlicht. Bei der Befüllung der Platte bildet sich ein Meniskus aus.

In den Bestrahlungsversuchen wurden Gasart (Argon, Stickstoff oder Sauerstoff), Inkubationszeit vor Bestrahlung (0 bis 12 h), Spannungsversorgung (0 bis 200 V) und Bestrahlungszeit (10 bis 120 s) als Faktoren variiert.



**Abbildung 14: Schematische Abbildung der variierten Parameter**

Die Bestrahlungsversuche auf Kulturagar wurden mit verschiedenen Parametern durchgeführt. Zum einen wurden Argon, Stickstoff und Sauerstoff als Aktivgas eingesetzt, zum anderen wurde die Primärspannung zwischen 100 und 200 V variiert. Ein weiterer zu untersuchender Parameter war die Bestrahlungszeit. Diese wurde zwischen 10 und 120 s variiert. Der Einfluss der Vorinkubation wurde anhand der Variation der Vorinkubationszeiten untersucht. Als Negativkontrolle wurde die Probe nur mit einem Gasstrahl bestrahlt, ohne Zuschaltung der Spannung. Der Einfluss des Ozongehaltes wurde mithilfe des Ozondeckels untersucht.

#### *Versuchsdurchführung zur Variation der Gasart, der Primärspannung und Bestrahlungsdauer*

Es wurde Bakteriensuspension *Pseudomonas fluorescens* mit  $1,125 \times 10^5$  Zellen / ml hergestellt. Diese wurde nach dem 4x4-Rasterprinzip in 5 µl-Tropfen auf zwölf mit King's B-Agar gefüllten Abklatschplatten aufgebracht. Anschließend wurden diese Agarplatten im Brutschrank bei 30 °C 2 h inkubiert.

Zur Plasmabehandlung wurden die Proben aus dem Brutschrank entnommen und zur kurzzeitigen Lagerung in den Kühlschrank überführt. Jeweils drei Proben wurden einzeln nacheinander im Plasmagenerator mit den in Tabelle 2 aufgelisteten unterschiedlichen Plasmaparametern behandelt. Die vierte Probe wurde als Negativkontrolle genutzt und nicht plasmabehandelt.

**Tabelle 2: Variation der Plasmaparameter Aktivgas, Primärspannung und Bestrahlungsdauer zur Behandlung der *Pseudomonas fluorescens* auf einer Kulturagaroberfläche**

	Für Versuche eingesetzte Plasmaparameter			
	Gasdruck	Aktivgas	Primärspannung	Bestrahlungsdauer
Variation Aktivgas	0,2 bar	Argon, Stickstoff und Sauerstoff	200 V	60 s
Variation Primärspannung	0,2 bar	Sauerstoff	100; 150 und 200 V	60 s
Variation Bestrahlungsdauer	0,2 bar	Sauerstoff	200 V	10; 60 und 120 s

Nach der Behandlung wurden alle Proben im Brutschrank für 22 h weiterinkubiert. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 24 h waren Kolonien erkennbar. Die fluoreszierenden *Pseudomonaden* wurden unter Einsatz von UV-Strahlung mit der Wellenlänge 365 nm fotografiert. Die Bilddaten



wurden mit ImageJ ausgewertet. Dazu wurde die Koloniezahl ermittelt und die Durchmesser der Kolonien bestimmt.

#### *Versuchsdurchführung zur Variation der Inkubationszeit*

In Abweichung zu den vorhergehenden Versuchen wurde eine Bakteriensuspension von  $8,75 \times 10^4$  Zellen / ml *Pseudomonas fluorescens* hergestellt. Diese wurde nach dem 4 x 4-Rasterprinzip in 5 µl-Tropfen auf 15 mit King's B-Agar gefüllten Abklatschplatten aufgebracht.

Die erste Probe mit der Bezeichnung 0 h wurde unmittelbar nach dem Beimpfen des Agars mit einem Sauerstoffplasma bei einer Primärspannung von 200 V und einem Gasdruck von 0,2 bar 60 s bestrahlt. Die restlichen Proben wurden zeitgleich in den Brutschrank mit einer Temperatur von 30 °C gegeben. Nach der Plasmabehandlung wurde die Probe 0 h zu den restlichen Proben in den Brutschrank gestellt. Wiederkehrend wurden aller zwei Stunden die nächsten Proben mit den gleichen Plasmametern behandelt. Somit wurde die Vorinkubationszeit zwischen 0 und 12 h variiert. Als Negativkontrolle wurden drei Proben zeitgleich mit den Bestrahlungsproben aus dem Inkubationsschrank entnommen. Die Negativproben 1 bis 3 wurden jeweils mit der Probe 0 h, 2 h oder 4 h parallel entnommen und weiterinkubiert. Die Gesamtinkubation aller Proben betrug 24 h. Anschließend wurden die fluoreszierenden *Pseudomonaden* analog dem vorhergehenden beschriebenen Versuch auf Koloniegröße und -anzahl untersucht.

#### *Ozonkontrolle*

Um den Einfluss von Ozon zu prüfen, wurde in einem weiteren Versuch der unter „III. 1. Aufbau des Plasmagenerators – Präparation des Ozondeckels“ beschriebene Deckel verwendet.

Für diesen Versuch wurde eine Bakteriensuspension *Pseudomonas fluorescens* mit einer Zellkonzentration von  $8,75 \times 10^4$  Zellen / ml hergestellt. Diese wurde analog den vorherigen Versuchen im 4 x 4-Rasterprinzip auf fünf mit King's B-Agar gefüllte Abklatschplatten aufgebracht. Anschließend wurden die Proben bei 30 °C zwei Stunden vorinkubiert.

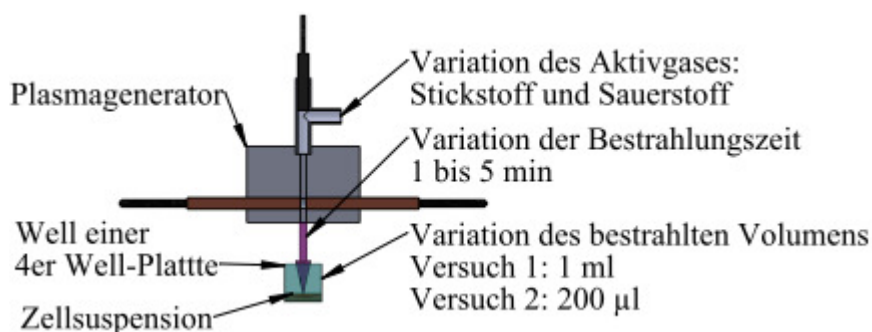
Zur Bestrahlung wurden die fünf Proben aus dem Brutschrank entnommen und vier Proben wurden mit einem Sauerstoffplasma mit einer Primärspannung von 200 V und einem Gasdruck von 0,2 bar 60 s bestrahlt. Dabei wurde die Proben O3-1 und O3-2 durch die Verwendung des Ozondeckels vor der optischen und der Teilchenstrahlung geschützt. Die Proben O3-3 und O3-4 wurden ohne Ozondeckel dem Plasmastrahl ausgesetzt. Bei den Proben O3-1 und O3-3 wurde jeweils der Laborabzug eingeschaltet. Dieser wurde bei den Proben O3-2 und O3-4 ausgeschaltet. Somit konnte sich das Ozon bei diesen Proben verstärkt in der Einhausung des Plasmagenerators ansammeln. Die Probe O3-negativ wurde als Negativkontrolle nicht mit Plasma behandelt.



Nach einer Gesamtinkubationszeit von 24 h waren Kolonien erkennbar. Die Bestimmung der Koloniegröße und Anzahl fluoreszierenden *Pseudomonaden* erfolgte analog den vorhergehenden Versuchen.

### 3. 4. 2. Bestrahlung von *Pseudomonas fluorescens* als Zellsuspension

Die Bestrahlung als Zellsuspension erfolgte in 4er-Well-Platten. Diese besitzen vier Kavitäten mit einem Durchmesser von 16 mm und einer Höhe von 8 mm. Dazu wurden die Wells mit jeweils 1 ml (bzw. 200 µl) Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von 0,56 (bzw. 0,68) befüllt und im Plasmagenerator bei maximalen Intensitäten, d. h. einer Primärspannung von 200 V, welche eine Sekundärspannung von 8 kV nach sich zieht, für ein bis fünf Minuten mit Stickstoff- und Sauerstoff-Plasma bestrahlt.



**Abbildung 15: Schematische Abbildung Bestrahlung der Zellsuspension**

In der schematischen Darstellung sind der Plasmagenerator und die Bestrahlung der Zellsuspension in einer Kavität gezeigt.

Die Bestrahlungsversuche der Bakteriensuspension wurden mit verschiedenen Parametern durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde ein Zellsuspensionsvolumen von 1 ml bestrahlt. In einem zweiten Versuch wurde das Volumen auf 200 µl reduziert. In beiden Versuchen wurde mit Stickstoff und Sauerstoff als Aktivgas bei einem Gasdruck von 0,1 bar gearbeitet und eine Primärspannung von 200 V angelegt. Im ersten Versuch wurde die Bestrahlungszeit zwischen 1 und 5 min variiert. Im zweiten Versuch war eine maximale Bestrahlungszeit von 2 min möglich, da aufgrund des geringen Volumen der Bakteriensuspension die Probe sonst vollständig getrocknet werden wäre.

### Absorptionsspektrum des Kulturmediums Nutrient-Broth No.2

Um das Eindringungsvermögen der optischen Strahlung in das Kulturmedium Nutrient-Broth No.2 zu bestimmen wurde das Absorptionsspektrum des Mediums im Spektrometer specord 200 der Firma Analytik Jena vermessen. Dazu wurden 1 ml Nutrient-Broth No2-Medium in eine Quarzglasküvette QS 10.00 mm der Firma Hellma Analytics gegeben. Die Quarzglasküvette war notwendig, um auch das Absorptionsspektrum im ultravioletten Strahlungsbereich messen zu können, da UV-Strahlung von Kunststoffen und anderen Gläsern absorbiert wird. Die Schichtdicke des Mediums welche durchstrahlt wurde, betrug 10 mm. Aus der gemessenen Extinktion wurde das Transmissionsspektrum wie folgt berechnet:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

**Formel 13: Transmissionsgrad [Meschede] mit**

T... Transmissionsgrad  
 I... einfallende Intensität  
 I<sub>0</sub>... transmittierte Intensität

$$E_\lambda = \lg \frac{I_0}{I} = \alpha \cdot d$$

**Formel 14: Lambert-Beer-Bouger-Gesetz [Meschede] mit**

E<sub>λ</sub>... gemessene Extinktion  
 α... Absorptionskoeffizient  
 d... Dicke d (d = 10 mm)

Aus Formel 13 und Formel 14 resultiert:

$$\begin{aligned} \frac{I_0}{I} = \frac{1}{T}; \quad E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) &\Rightarrow E_\lambda = \lg\left(\frac{1}{T}\right) \\ &\Rightarrow T = \frac{1}{e^{E_\lambda}} \end{aligned}$$

*Versuch 1- Bestrahlung von 1 ml Zellsuspension*

Im ersten Versuch wurde eine Bakteriensuspension *Pseudomonas fluorescens* mit einer Extinktion von 0,56 verwendet. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von 8,75 x 10<sup>9</sup> Zellen / ml. Mit dieser unverdünnten Zellsuspension wurden fünf 4er Zellkulturtestplatten mit 1 ml pro Kavität befüllt. Jeweils drei Wells pro Platte wurden mit folgenden Parametern bestrahlt:

**Tabelle 3: Parameternaufstellung für den Bestrahlungsversuch der Bakteriensuspension Versuch 1**

Probe	Aktivgas	Bestrahlungszeit
1	Stickstoff	1 min
2	Stickstoff	5 min
3	Sauerstoff	1 min
4	Sauerstoff	5 min
5 - Negativkontrolle	-	-

Der Gasdruck von 0,1 bar und die Primärspannung von 200 V wurden in diesem Versuch nicht verändert. Nach der Bestrahlung wurden aus jedem Well 500 µl entnommen und in 20 ml frisches Nutrient-Broth No.2-Medium überführt. Die Proben wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen im Schüttler bei 30 °C und 260 rpm inkubiert. Bei einer Inkubationszeit von 123 und 190 min nach Inkubationsbeginn wurde die Bakterienanzahl anhand der optischen Dichte bestimmt.

### Versuch 2 – Bestrahlung von 200 µl Zellsuspension

In Abweichung zum vorhergehenden Versuch wurde im zweiten Versuch eine Bakteriensuspension mit einer Extinktion von 0,68 (entspricht  $1,06 \times 10^{10}$  Zellen / ml) verwendet und das Zellsuspensionsvolumen pro Well auf 200 µl reduziert. Es wurden vier 4er Wellplatten befüllt. Jeweils drei Wells pro Platte wurden mit folgenden Parametern bestrahlt:

**Tabelle 4: Parameternaufstellung für den Bestrahlungsversuch der Bakteriensuspension Versuch 2**

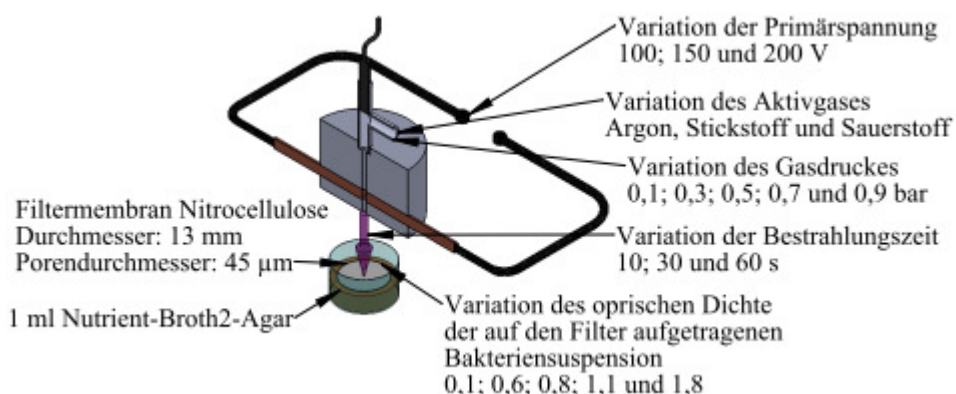
Probe	Aktivgas	Bestrahlungszeit
1	Stickstoff	1 min
2	Stickstoff	2 min
3	Sauerstoff	1 min
4 - Negativkontrolle	-	-

Als feste Plasmaparameter wurde in diesem Versuch die Primärspannung mit 200 V und der Gasdruck mit 0,1 bar nicht verändert.

Nach der Bestrahlung wurden aus jedem Well 50 µl entnommen und in 20 ml frisches Nutrient-Broth No.2-Medium überführt. Die Proben wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen im Schüttler bei 30 °C und 260 rpm inkubiert. 97, 244 und 358 min nach Inkubationsbeginn wurde die Bakteriendichte anhand der optischen Dichte bestimmt.

### 3. 4. 3. Bestrahlung von *Pseudomonas fluorescens* auf Filterpapier

Als Weiterentwicklung der Bestrahlung auf Agar und in Flüssigkultur wurde in dieser Arbeit die Bestrahlung auf Filtermembranen erprobt und entwickelt.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Bestrahlungsversuche auf Filtermembranen**

Für die Bestrahlung der Bakteriensuspension auf Filtermembranen wurden 4er Zellkulturtestplatten mit 1 ml Nutrient-Broth No.2-Agar befüllt und nach Aushärten des Agars mit Nitrocellulosemembranen mit einem Durchmesser von 13 mm belegt. Die zu bestrahlende Bakteriensuspension wurde anschließend auf den Filter pipettiert. Innerhalb der Bestrahlungsversuchsreihe auf Filtermembranen wurden das Aktivgas, der Gasdruck, die Primärspannung, die Bestrahlungszeit und die optische Dichte der aufgetragenen Bakteriensuspension variiert.

Zur Vorbereitung dieser Versuche wurden 4er-Well-Platten mit 1 ml Nutrient-Broth No.2-Agar pro Kavität befüllt. Nach dem Abkühlen und Aushärten des Agars wurden die Filter (Nitrocellulose-Membran mit 0,45 µm Porengröße) auf die Agar-Fläche gegeben. Anschließend wurden auf die Filtermembranen 5 µl Bakteriensuspension pipettiert.

Die beimpften Filter wurden auf der Agar-Oberfläche im Plasmagenerator bestrahlt.

Nach der Bestrahlung wurden die Filter aus den Kavitäten entnommen und in 1 ml frisches Medium überführt. Mittels rotierender Bewegungen wurden die Bakterien im Medium aufgenommen. Jeweils 100 µl angeimpftes Medium wurden entnommen und in eine Mikrotiterplatte überführt.

Das Wachstumsverhalten in der 96er-Platte wurde anhand der Absorptionsdurchlässigkeit der einzelnen Proben mit Hilfe des FLUOstar Omega Plattenreaders der Firma LabTech über eine Zeit von 21 h gemessen und anhand der zeitlichen Wachstumsverzögerung ausgewertet.

#### *Experimentelle Kalibrierung der Bakterienkonzentration auf den zeitlichen Beginn der exponentiellen Wachstumsphase*

Um Rückschlüsse auf die plasmainduzierte Keimreduzierung ziehen zu können, wurde das Verhältnis zwischen Verdünnung der Bakteriensuspension und Verzögerung des exponentiellen Wachstums untersucht. Dazu wurde eine Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von 0,67 erzeugt. Da eine optische Dichte von 0,64 bei *Pseudomonaden* einer Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^{10}$  Zellen / ml entspricht [bionumbers, 2012] ist bei einer optischen Dichte von 0,67 von einer Bakterienkonzentration von  $1,05 \times 10^{10}$  Zellen / ml auszugehen. Aus dieser Zellsuspension wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis hin zu einer Verdünnung von  $10^5$  hergestellt. Diese Verdünnungsreihe wurde, analog zu den Filterbestrahlungsversuchen, mit einem Volumen von je 5 µl in 1 ml Nutrient-Broth No.2-Medium überführt. Pro Verdünnungsstufe wurden acht Kavitäten einer 96er Mikrotiterplatte (TPP) mit jeweils 100 µl befüllt. Die Kavitäten wurden anschließend mit einer Abdeckfolie ViewSeal verschlossen. Zur Auswertung wurde die 96er Platte in den Plattenreader FLUOstar Omega bei 30 °C gegeben. Die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde alle fünf Minuten über eine Gesamtdauer von 21 h gemessen. Anschließend wurde die zeitliche Verzögerung der Probe bei Erreichen des Extinktionswert von 0,2 betrachtet und exponentiell dargestellt.

#### *Variation der optischen Dichte*

Zur Versuchsvorbereitung wurden fünf Bakteriensuspensionen mit unterschiedlichen Extinktionen: 0,13; 0,62; 0,78; 1,07 und 1,76 hergestellt. Pro Bakteriensuspension wurden acht Filter mit 5 µl Zellsuspension beimpft.

Die eine Hälfte der beimpften Filter wurde mit einem Sauerstoffplasma mit einem Gasdruck von 0,2 bar und 200 V Primärspannung 60 s bestrahlt. Die andere Hälfte blieb als Negativkontrolle unbehandelt.

Anschließend wurden die Filter in 2,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Mit 1 ml Medium wurden die Bakterien vom Filter abgewaschen und in das Medium aufgenommen. Pro Zentrifugenröhrchen wurden zweimal 100 µl des beimpften Mediums entnommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Mit dem Plattenreader FLUOstar Omega wurde die Extinktion bei 600 nm alle 5 min über eine Inkubationszeit von 21 h gemessen. Neben der Aufnahme einer Wachstumskurve wurde die zeitliche Wachstumsverzögerung zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben bis zu einer Extinktion von 0,2 bestimmt, um Rückschlüsse auf die prozentual inaktivierten Keime ziehen zu können.

#### *Versuchsdurchführung zur Variation der Gasart, der Primärspannung, Bestrahlungsdauer und Gasdruck*

Zur Versuchsvorbereitung wurde eine Bakteriensuspension mit einer Extinktion von 0,25 bis 0,51 hergestellt. Fünf bzw. zwölf der mit Nutrient-Broth No.2-Agar befüllten 4er Zellkulturtestplatten wurden mit einem Filter pro Kavität bestückt. Anschließend erfolgte die Benetzung der Filtermembranen mit 5 µl Bakteriensuspension. Die Plasmabehandlung mit jeweiliger Variation der Gasart, der Primärspannung, der Bestrahlungsdauer und des Gasdruckes erfolgte ohne zeitliche Verzögerung nach Tabelle 5. Eine der beimpften Platten blieb als Negativkontrolle unbehandelt.

**Tabelle 5: Variation der Plasmaparameter Gasdruck, Aktivgas, Primärspannung und Bestrahlungsdauer zur Behandlung der *Pseudomonas fluorescens* auf Filterpapier**

	Optische Dichte	Für Versuche eingesetzte Plasmaparameter			
		Gasdruck	Aktivgas	Primärspannung	Bestrahlungsdauer
Variation Gasdruck	0,25	0,1; 0,3; 0,5; 0,7 und 0,9 bar	Sauerstoff	200 V	60 s
Variation Aktivgas	0,51	0,2 bar	Argon, Stickstoff und Sauerstoff	200 V	90 s
Variation Primärspannung	0,51	0,2 bar	Sauerstoff	100; 150 und 200 V	90 s
Variation Bestrahlungsdauer	0,40	0,2 bar	Sauerstoff	200 V	10; 30 und 60 s

Bei der Variation des Gasdruckes wurden, um den Einfluss des Gasdruckes zu ermitteln, Negativkontrollen mit den gleichen Gasdrücken wie in den Plasmabestrahlungsversuchen angewendet jedoch ohne Spannungszuschaltung bestrahlt.

Die behandelten Filter wurden anschließend analog den vorhergehenden Versuchen in Medium aufgenommen und das Wachstumsverhalten mit dem Plattenreader analysiert. Anhand der zeitlichen Wachstumsverzögerung wurde die Anzahl der aktiven Bakterien auf dem Filter bestimmt.

## 4. Ergebnisse

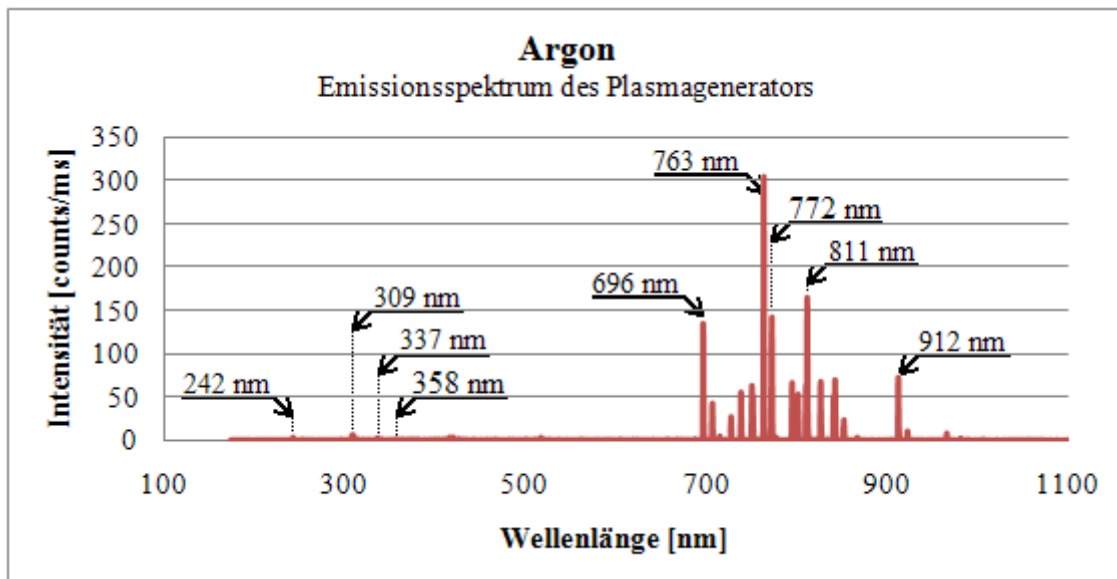
Im folgenden Kapitel werden zum einen die physikalischen Ergebnisse der Plasmacharakterisierung und zum anderen die biologischen Ergebnisse in der Plasmabehandlung der *Pseudomonas fluorescens* dargestellt.

### 4. 1. Charakterisierung der Plasmaflamme

#### 4. 1. 1. Optisches Spektrum

Eine absolute Intensitätsangabe für das optische Spektrum war im Rahmen der Masterarbeit nicht möglich, da die Effizienz des Spektrometers nicht bekannt war.

Argon



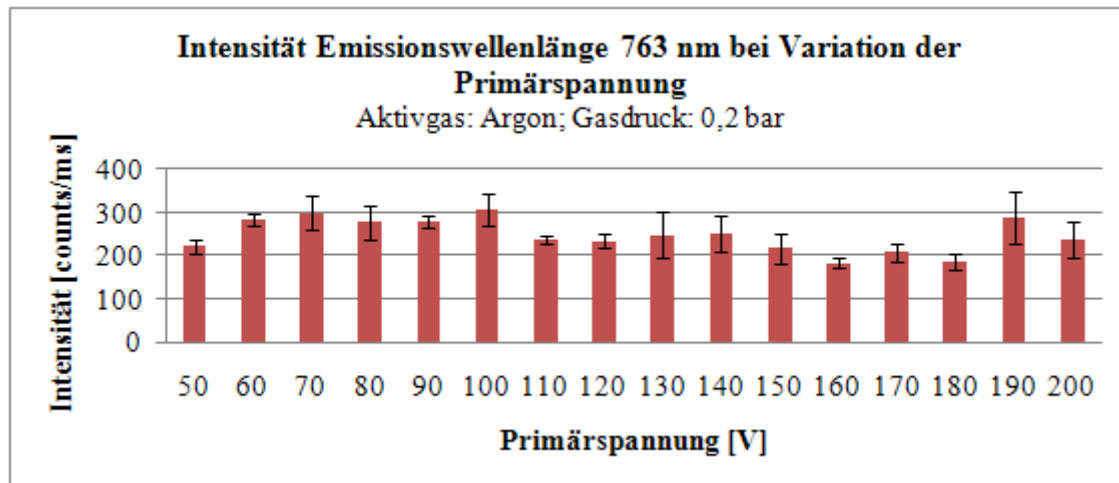
**Abbildung 17: Emissionsspektrum des Plasmagenerators mit von Argon als Aktivgas**

Das dargestellte Emissionsspektrum wurde mit einem Gasdruck von 0,2 bar und 100 V Primärspannung aufgenommen.

Die Emissionsmaxima des Argon-Plasmastrahls liegen zwischen 690 und 860 nm. Im UV-Bereich zeigt das Emissionsspektrum Intensitäten von weniger als 10 counts / ms. Die ozongenerierende Wellenlänge 242 nm besitzt eine Intensität von 3 counts / ms. Auch die weiteren im UV-Bereich detektierten Wellenlängen (309 nm, 337 nm und 358 nm) besitzen im Gegensatz zur Emission im infraroten Bereich eine geringe Intensität von 2 bis 8 counts / ms. Das Emissionsmaximum liegt mit

einer Intensität von 305 counts / ms bei einer Wellenlänge von 763 nm. Die im Argon-Plasma detektierten Wellenlängen sind mit den jeweiligen Intensitäten und der Halbwertsbreite im Anhang unter Tabelle A 7 aufgelistet.

Die Intensität der maximalen Emissionswellenlänge wurde in Abhängigkeit von der Primärspannung untersucht.

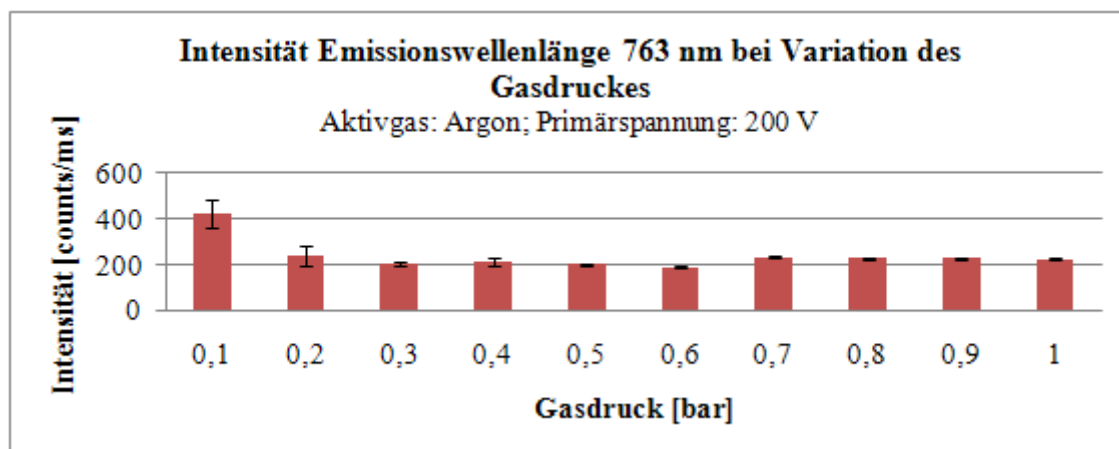


**Abbildung 18: Intensitätsänderungen der maximalen Emissionswellenlänge 763 nm in Abhängigkeit von der Primärspannung**

Dargestellt ist die Intensitätsänderung der Emissionswellenlänge 763 nm in Abhängigkeit von der Primärspannung bei einem konstanten Gasdruck von 0,2 bar

Die Intensität der Emissionswellenlänge 763 nm ändert sich mit Variation der Primärspannung. Die geringste Intensität befindet sich bei einer Primärspannung von 160 V (dies entspricht einer Sekundärspannung von 6,4 kV) mit 183 counts / ms. Die größte Intensität liegt mit 305 counts / ms bei einer Primärspannung von 100 V (Sekundärspannung beträgt 4 kV).

Des Weiteren wurde die Intensität in Abhängigkeit vom Gasdruck gemessen.

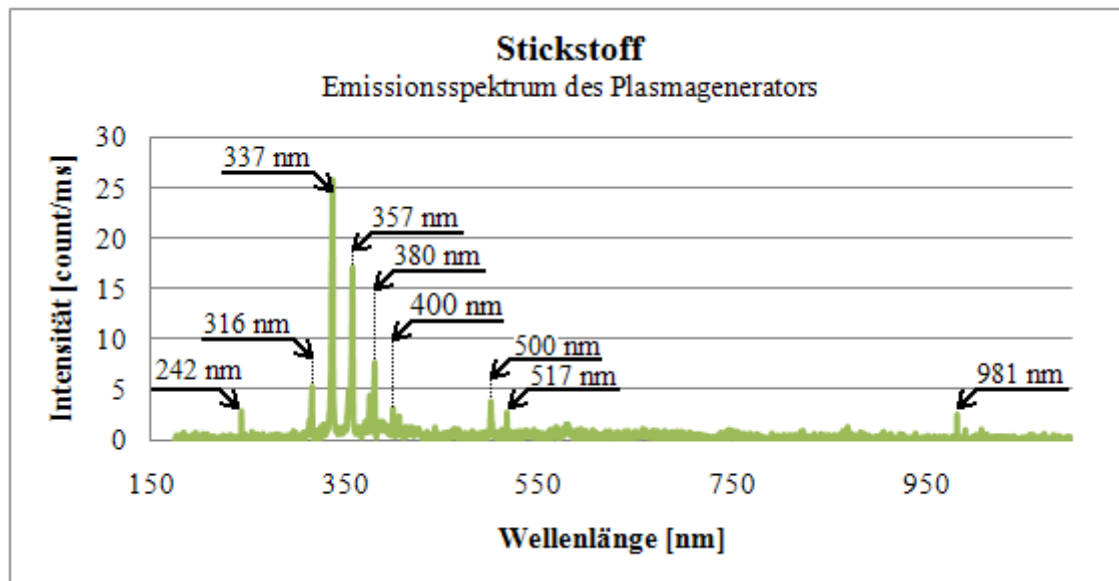


**Abbildung 19: Intensitätsänderungen der maximalen Emissionswellenlänge 763 nm in Abhängigkeit vom Gasdruck**

Dargestellt ist die Intensitätsänderung der Emissionswellenlänge 763 nm in Abhängigkeit vom Gasdruck bei einer konstanten Primärspannung von 200 V

Die Intensität der Emissionswellenlänge 763 nm ändert sich mit Variation des Gasdrucks. Die größte Intensität liegt mit 421 counts / ms bei einem Gasdruck von 0,1 bar. Bei einem Gasdruck von 0,2 bar beträgt die Intensität 238 counts / ms. Die bei einem Gasdruck von 0,3 bis 1 bar gemessenen Intensitäten betragen 188 bis 227 counts / ms.

### Stickstoff



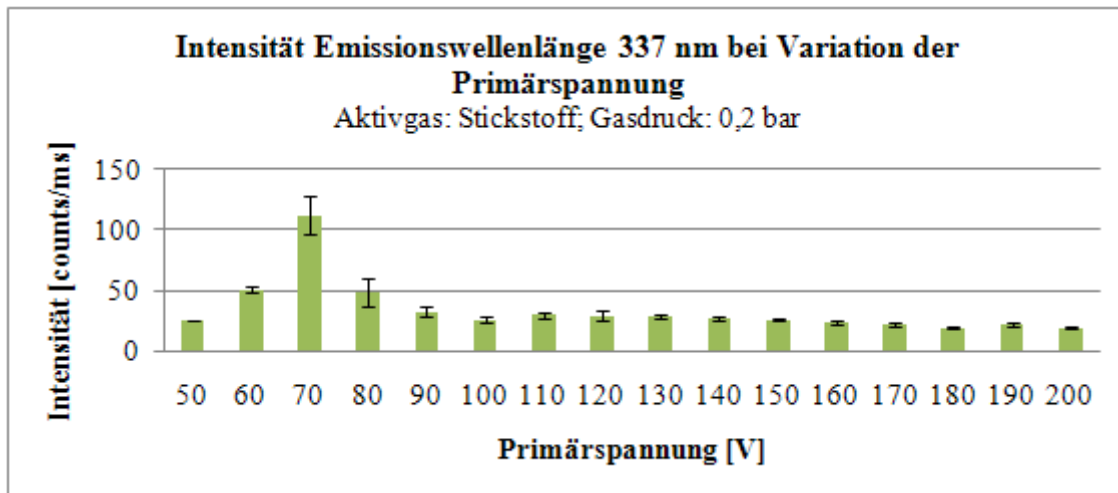
**Abbildung 20: Emissionsspektrum des Plasmagenerators mit Stickstoff als Aktivgas**

Das dargestellte Emissionsspektrum wurde mit einem Gasdruck von 0,2 bar und 100 V Primärspannung aufgenommen.

Die Emissionsmaxima des Stickstoff-Plasmastrahls liegen zwischen 310 und 410 nm. Im UV-Bereich wurde das größte Emissionsspektrum detektiert. Die ozongenerierende Wellenlänge 242 nm wurde mit einer Intensität von 3 counts / ms detektiert. Die weiteren im UV-Bereich detektierten Wellenlängen (337 nm und 357 nm) besitzen im Gegensatz zur Emission im infraroten Bereich eine hohe Intensität von bis zu 25 counts / ms. Die Wellenlänge der maximalen Intensität beträgt 337 nm. Im visuell sichtbaren Bereich befindet sich die maximale Intensität von 4 counts / ms bei einer Wellenlänge von 500 nm. Die im Stickstoff-Plasma detektierten Wellenlängen mit den jeweiligen Intensitäten und der Halbwertsbreite sind in der Tabelle A 8 aufgelistet.

Die Intensität der maximalen Emissionswellenlänge von 337 nm wurde in Abhängigkeit von der Primärspannung untersucht.



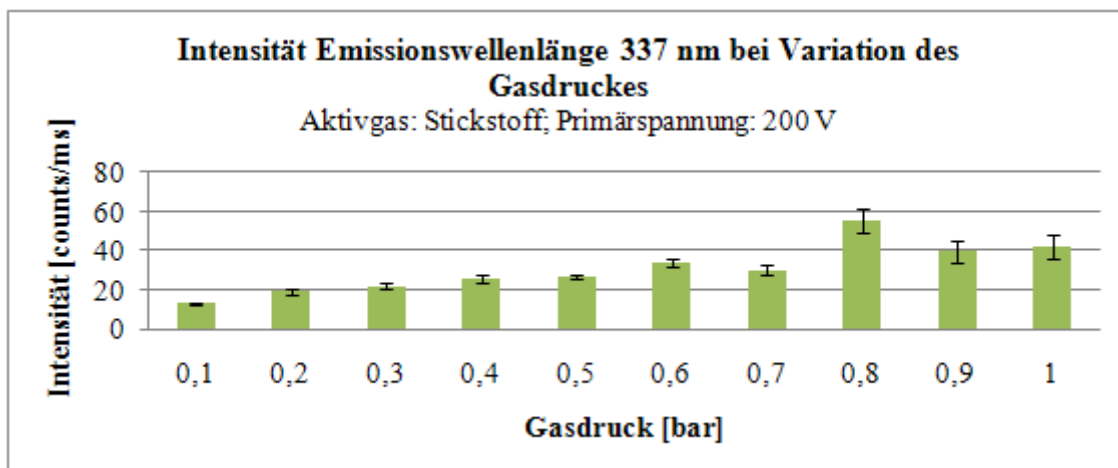


**Abbildung 21: Intensitätsänderungen der maximalen Emissionswellenlänge 337 nm in Abhängigkeit von der Primärspannung**

Dargestellt ist die Intensitätsänderung der Emissionswellenlänge 337 nm in Abhängigkeit von der Primärspannung bei einem konstanten Gasdruck von 0,2 bar.

Die Intensität der Emissionswellenlänge 337 nm ändert sich mit Variation der Primärspannung. Die größte Intensität liegt mit 112 counts / ms bei einer Primärspannung von 70 V (Sekundärspannung beträgt 2,8 kV). Bei einer Primärspannung von 60 und 80 V liegt die gemessene Intensität bei 50 counts / ms. Die Primärspannungen 50 V und 90 bis 200 V ergeben eine Intensität von 19 bis 33 counts / ms.

Des Weiteren wurde die Intensität in Abhängigkeit vom Gasdruck gemessen.

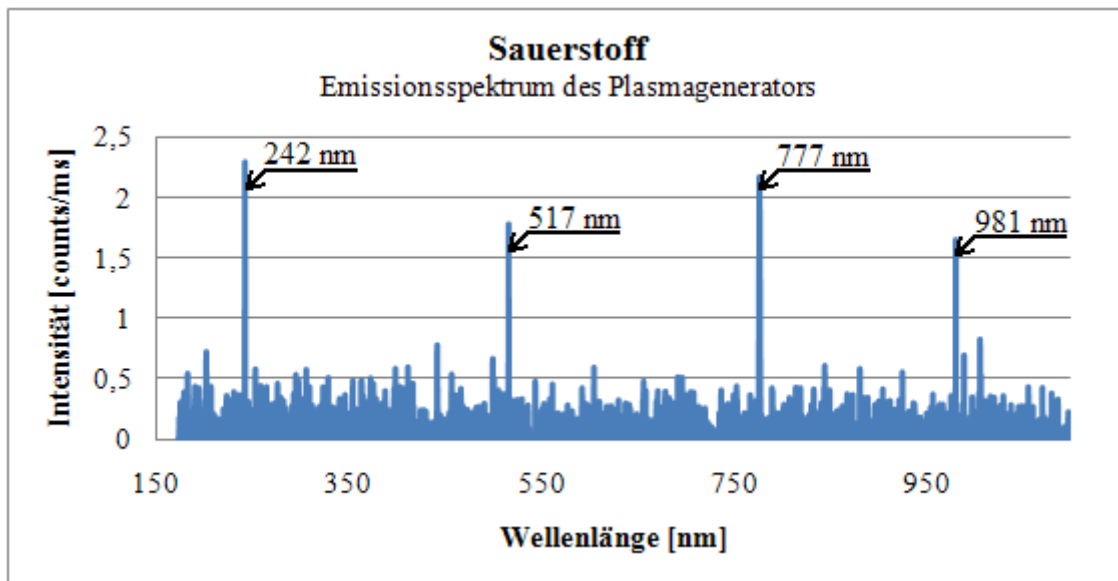


**Abbildung 22: Intensitätsänderungen der maximalen Emissionswellenlänge 337 nm in Abhängigkeit vom Gasdruck**

Dargestellt ist die Intensitätsänderung der Emissionswellenlänge 337 nm in Abhängigkeit vom Gasdruck bei einer konstanten Primärspannung von 200 V.

Die Intensität der Emissionswellenlänge 337 nm ändert sich mit Variation des Gasdrucks. Die größte Intensität liegt mit 55 counts / ms bei einem Gasdruck von 0,8 bar. Die geringste Intensität beträgt 13 counts / ms bei einem Gasdruck von 0,1 bar.

## Sauerstoff



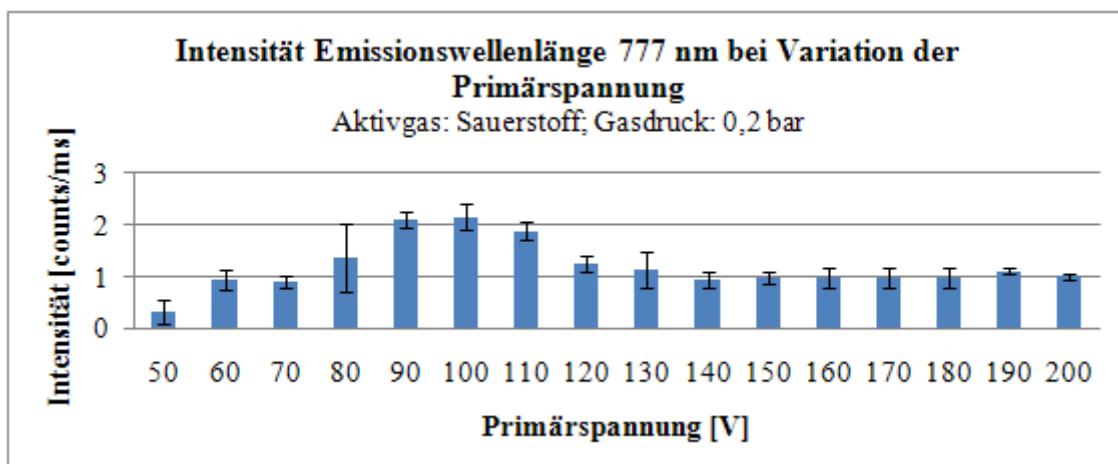
**Abbildung 23: Emissionsspektrum des Plasmagenerators mit Sauerstoff als Aktivgas**

Das dargestellte Emissionsspektrum wurde mit einem Gasdruck von 0,2 bar und 100 V Primärspannung aufgenommen.

Die ozongenerierende Wellenlänge 242 nm besitzt eine Intensität von 2 counts / ms. Im sichtbaren Bereich befinden sich die Wellenlängen 517 und 777 nm mit Intensitäten von 2 counts / ms. Die im infraroten Bereich liegende Wellenlänge von 981 nm besitzt eine Intensität von unter 2 counts / ms.

Die im Sauerstoff-Plasma detektierten Wellenlängen mit den jeweiligen Intensitäten und der Halbwertsbreite sind in der Tabelle A 9 aufgelistet.

Die Intensität der maximalen Emissionswellenlänge von 777 nm wurde in Abhängigkeit von der Primärspannung bei einem konstanten Gasdruck untersucht.

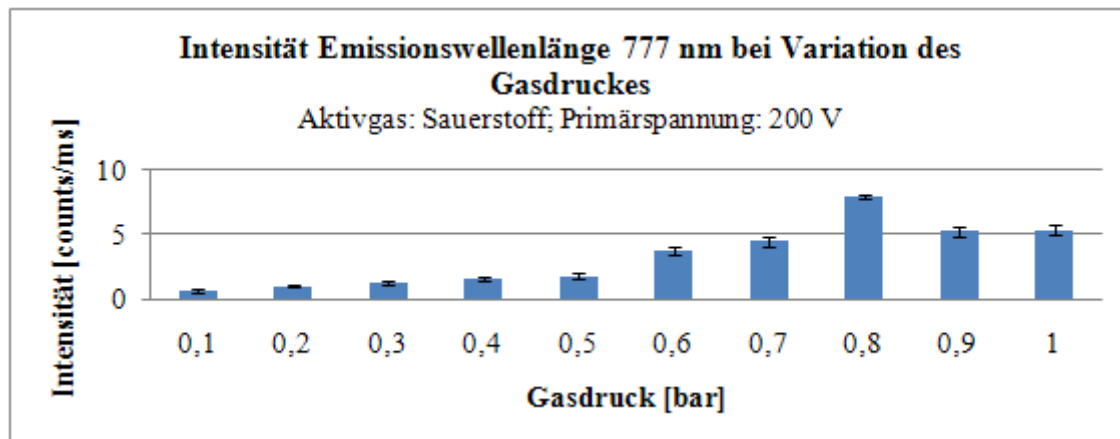


**Abbildung 24: Intensitätsänderungen der maximalen Emissionswellenlänge 777 nm in Abhängigkeit von der Primärspannung**

Dargestellt ist die Intensitätsänderung der Emissionswellenlänge 777 nm in Abhängigkeit von der Primärspannung bei einem konstanten Gasdruck von 0,2 bar.

Die Intensität der Emissionswellenlänge 777 nm ändert sich mit Variation der Primärspannung. Die größte Intensität liegt mit 2 counts / ms bei einer Primärspannung von 100 V (Sekundärspannung beträgt 4 kV). Bei einer Primärspannung von 140 und 200 V liegt die gemessene Intensität bei 1 counts / ms. Bei einer Primärspannung von 50 V beträgt die 0,3 counts / ms.

Außerdem wurde die Intensität in Abhängigkeit vom Gasdruck gemessen.



**Abbildung 25: Intensitätsänderungen der maximalen Emissionswellenlänge 777 nm in Abhängigkeit vom Gasdruck**

Dargestellt ist die Intensitätsänderung der Emissionswellenlänge 777 nm in Abhängigkeit vom Gasdruck bei einer konstanten Primärspannung von 200 V.

Die Intensität der Emissionswellenlänge 777 nm ändert sich mit Variation des Gasdrucks. Die größte Intensität liegt mit 8 counts / ms bei einem Gasdruck von 0,8 bar. Die geringste Intensität beträgt 0,3 counts / ms bei einem Gasdruck von 0,1 bar.

#### 4. 1. 2. Ozongehalt

Bei einer Wellenlänge von 242 nm wird das Gas Ozon generiert. Daher ist die Auswertung der Strahlungsintensität bei dieser Wellenlänge von Bedeutung.

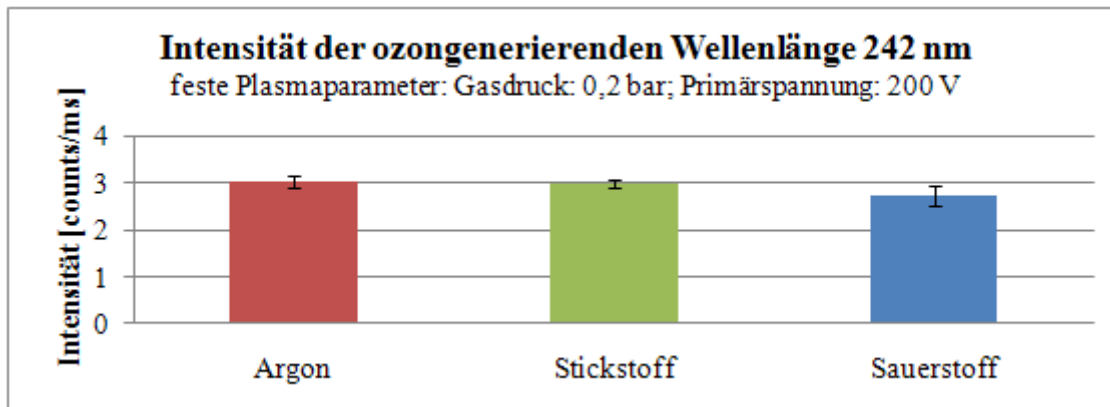


Abbildung 26: Strahlungsintensität der ozonbildenden Wellenlänge 242 nm bei Verwendung unterschiedlicher Aktivgase

Zwischen den drei Aktivgasen Argon, Stickstoff und Sauerstoff ist kein Unterschied in der Strahlungsintensität der Wellenlänge 242 nm zu erkennen. Alle drei Gase besitzen eine Intensität von 3 counts / ms.

Desweiteren wurde die Ozonkonzentration bei Verwendung der Aktivgase Argon, Stickstoff und Sauerstoff bei Variation der Primärspannung bestimmt.

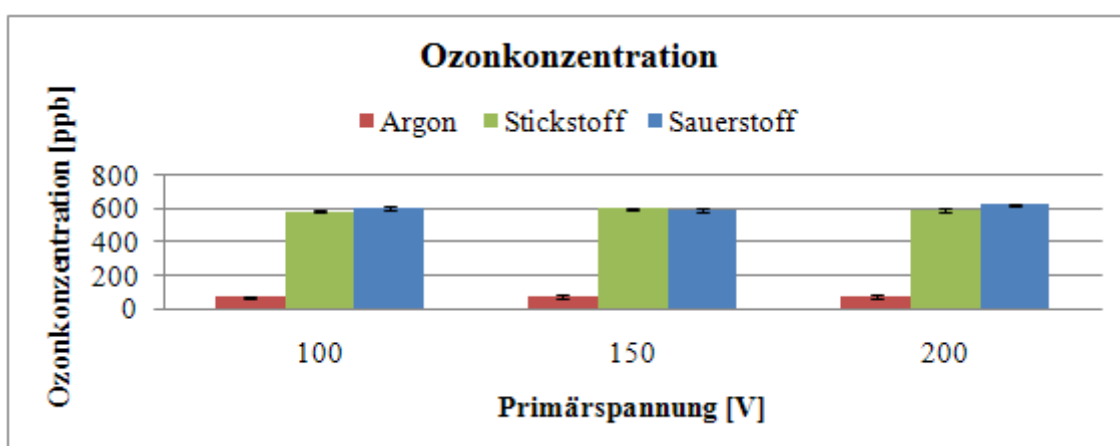


Abbildung 27: Bestimmung der Ozonkonzentration in ppb

Die Ozonkonzentration im Stickstoff- und Sauerstoff-Plasma ist um das achtfache höher als im Argon-Plasma.

Im Plasmagenerator wird innerhalb einer Bestrahlungszeit von 30 s eine Ozonkonzentration von 600 ppb bei Verwendung von Stickstoff oder Sauerstoff als Aktivgas generiert. Dabei gilt eine

Konzentration von  $360 \mu\text{g} / \text{m}^3$  (entspricht 180 ppb) bereits als gesundheitsschädlich. Nach einer Plasmabestrahlung von 60 s ist der Ozonwert nicht mehr bestimmbar, weil der maximale Messbereich von 1000 ppb überschritten wird.

Beim Einsatz von Argon als Aktivgas wird eine Ozonkonzentration von 69 bis 75 ppb erzeugt.

#### 4. 1. 3. Teilchenstrahlung

Die Teilchenstrahlung wird durch die im Plasma enthaltenen Ionen charakterisiert.

##### *Argon*

Unter Tabelle A 10 befindet sich im Anhang eine Auflistung der detektierten Wellenlängen und der emittierenden Ionen. Im Argon-Plasma werden vorwiegend einfach angeregte Argon-Ionen detektiert. Auch zweifach und dreifach Ionen werden detektiert. Diese emittieren vorwiegend im ultravioletten Bereich.

##### *Stickstoff*

Im roten und infraroten Bereich wurden einfach angeregte Stickstoff-Ionen detektiert. Ab einer Wellenlänge von 568 nm emittieren mehrfach angeregte Ionen. Die gemessenen Wellenlängen 380; 357 und 354 nm sind keine für das Element Stickstoff typischen Wellenlängen. Diese Wellenlängen stehen für angeregte Atome aus der Atmosphäre welche nicht bestimmt werden konnten. Die Stickstoff-Ionen mit den höchsten Strahlungsintensitäten (5 bis 25 counts / ms) sind mehrfach angeregte Ionen. Eine tabellarische Auflistung der detektierten Wellenlängen und der emittierenden Ionen befindet sich unter Tabelle A 11.

##### *Sauerstoff*

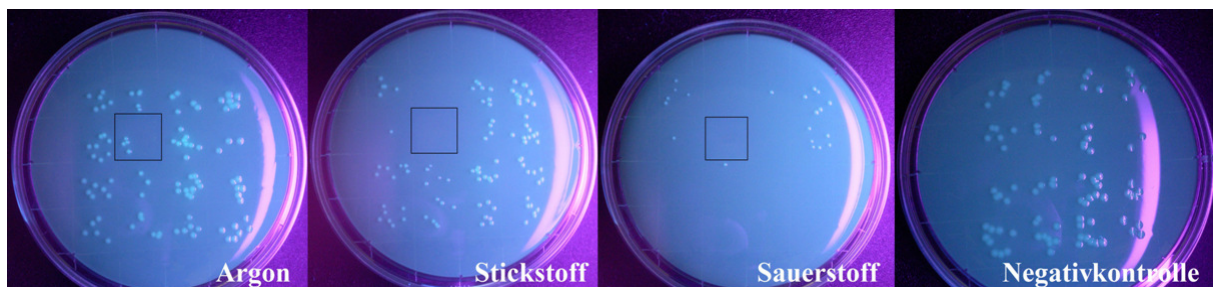
Eine tabellarische Auflistung der detektierten Wellenlängen und der emittierenden Ionen befindet sich unter Tabelle A 12 . Mit Hilfe des optischen Spektrums konnten einfach und zweifach angeregte Sauerstoff-Ionen detektiert werden. Das mit der höchsten Intensität von 2 counts/ms gemessene Ion bei 777 nm ist ein einfach angeregtes Sauerstoff-Ion.

## 4. 2. Bestrahlung von *Pseudomonas fluorescens*

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Bestrahlungsversuche auf Kulturagar, in Zellsuspension und auf Filterpapier beschrieben.

### 4. 2. 1. Bestrahlung von *Pseudomonas fluorescens* auf einer Kulturagaroberfläche

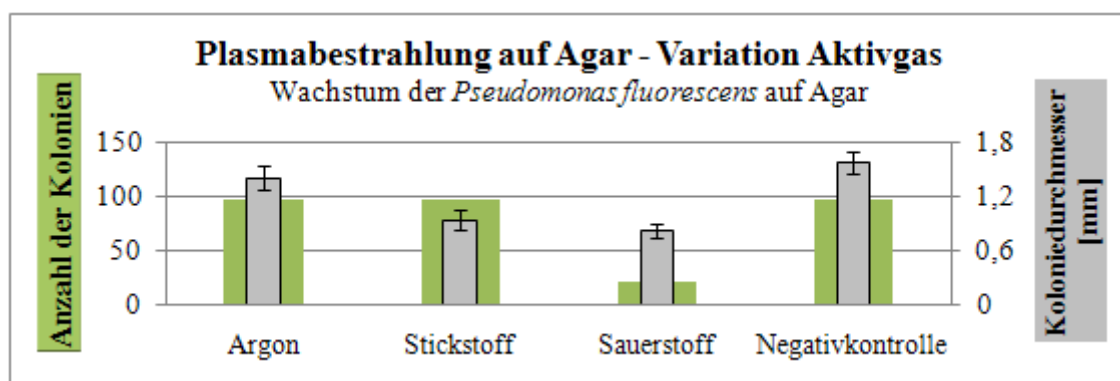
#### Variation der Gasart



**Abbildung 28: Variation des Aktivgases zwischen Argon, Stickstoff und Sauerstoff**

Diese Abbildung beinhaltet die Fotografien der unterschiedlich behandelten Agarplatten nach einer Gesamtinkubationszeit von 24 h. Die schwarzen Quadrate stellen das Bestrahlungszentrum dar.

Die mit „Argon“, „Stickstoff“ und „Sauerstoff“ beschrifteten Proben wurden mit konstanter Primärspannung, Gasdruck und Bestrahlungszeit plasmabehandelt. Dabei wurde das verwendete Aktivgas variiert. Das rechte Bild beinhaltet die Negativkontrolle, welche nicht bestrahlt wurde. Zu erkennen ist eine Reduktion der Kolonienanzahl auf der mit einem Sauerstoff-Plasma behandelten Agarplatte. Der Koloniedurchmesser ist auf der mit Stickstoff- und Sauerstoff-Plasma behandelten Probe reduziert.

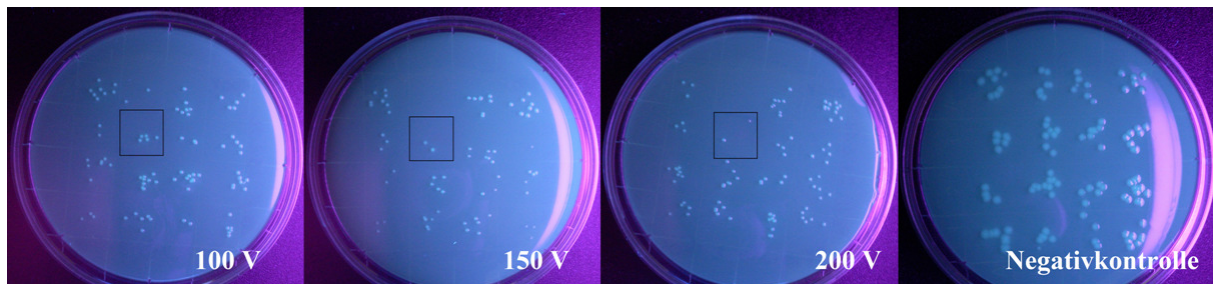


**Abbildung 29: Graphische Darstellung der Koloniegröße (grau dargestellt) und -anzahl (grün dargestellt) auf dem Kulturagar**

Die Kolonienanzahl und -größe wurde bei der Bestrahlung mit Sauerstoffplasma reduziert. Die Kolonie weist eine Reduktion ihrer Größe nach der Stickstoffplasmabestrahlung auf. Im Vergleich der Negativkontrolle zur der Argonplasmabestrahlung ist nur ein minimaler Unterschied in der Koloniegröße zu erkennen.

Die Anzahl der Kolonien wurde bei der Argon- und Stickstoff-Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle nicht reduziert. Bei der Behandlung mit Sauerstoff-Plasma wurde die Koloniezahlanzahl um 79% verringert. Die Koloniegröße der mit Stickstoff-Plasma behandelten *Pseudomonaden* wurde um 40% reduziert. Die Sauerstoff-Plasmabehandlung schmälerte den Koloniedurchmesser um 48%. Die Reduktion der mit dem Argon-Plasma bestrahlten Koloniegröße beträgt 11%.

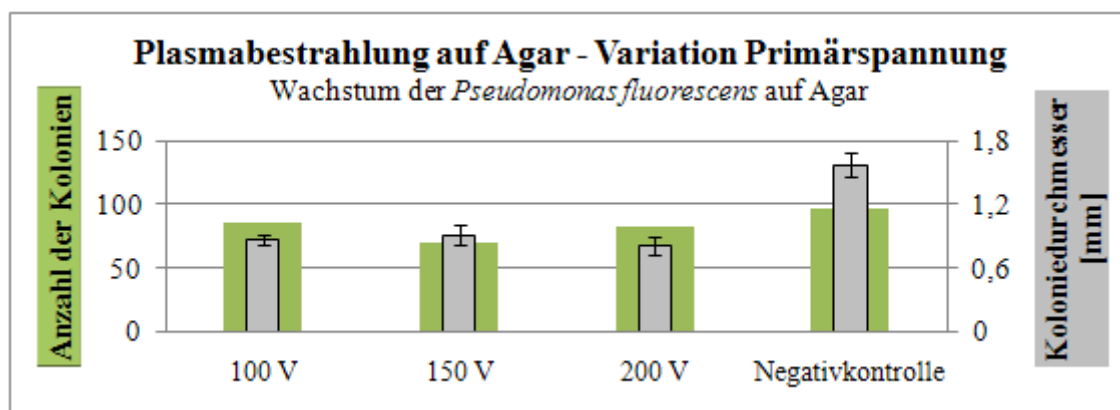
#### Variation der Primärspannung



**Abbildung 30: Variation der Primärspannung mit 100; 150 und 200 V**

Dargestellt sind die Fotografien der unterschiedlich behandelten Agarplatten nach einer Gesamtkubationszeit von 24 h. Die schwarzen Quadrate stellen das Bestrahlungszentrum dar.

Die Proben wurden mit Sauerstoff als Aktivgas, einem konstanten Gasdruck und einer gleichbleibenden Bestrahlungszeit plasmabehandelt. Dabei wurde die verwendete Primärspannung variiert. Das rechte Bild beinhaltet die Negativkontrolle, welche nicht bestrahlt wurde. Zu erkennen ist eine Reduktion der Koloniegröße auf der mit einem Sauerstoff-Plasma behandelten Agarplatten. Die Koloniezahlanzahl wurde ebenfalls reduziert. Unterschiede zwischen den eingesetzten Primärspannungen sind nicht zu erkennen.



**Abbildung 31: Graphische Darstellung der Koloniegröße (grau dargestellt) und -anzahl (grün dargestellt) auf dem Kulturagar**

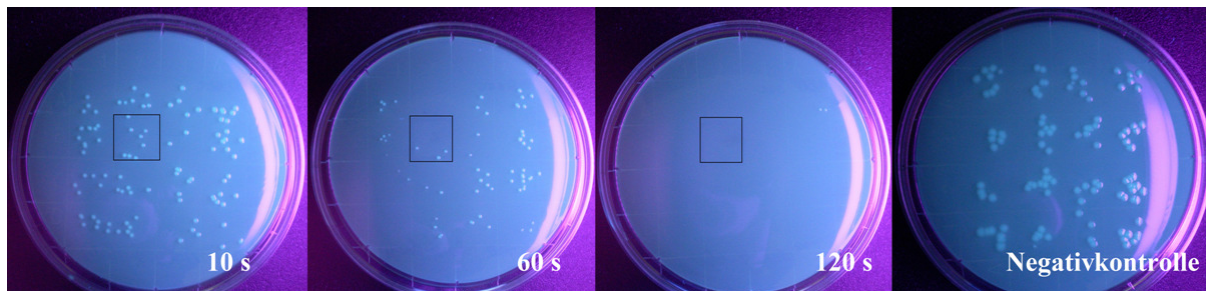
Im Gegensatz zur Negativkontrolle ist die Koloniegröße und -anzahl der bestrahlten *Pseudomonas fluorescens* reduziert.

Die Anzahl der Kolonien und die Koloniegröße wurden bei der Sauerstoff-Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle reduziert. Bei Verwendung einer Primärspannung von



100 V wurden die Koloniezahzahl um 11% und die Koloniegröße um 56% gesenkt. Bei 150 V wurden die Koloniezahzahl um 28% verringert und die Koloniegröße um 43% reduziert. Mit der Primärspannung 200 V wurde der Koloniedurchmesser um 48% und die Anzahl der Kolonien um 15% gemindert.

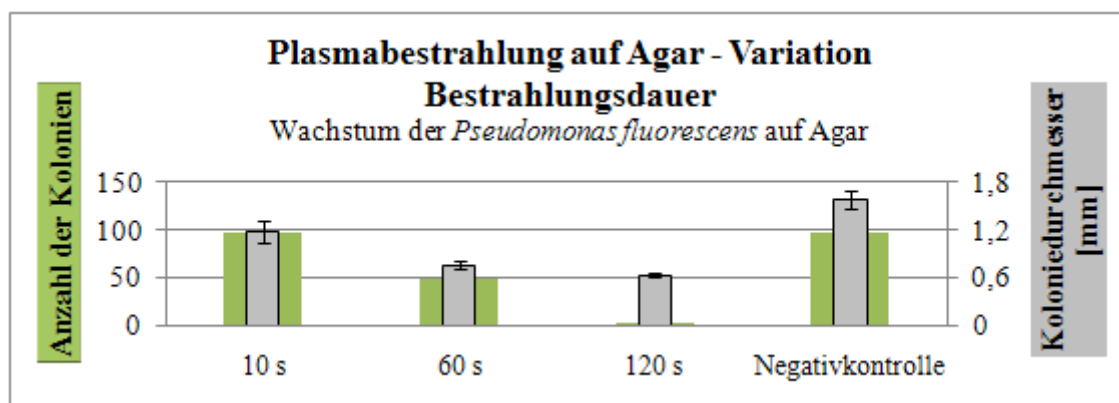
#### Variation der Bestrahlungsdauer



**Abbildung 32: Variation der Bestrahlungsdauer zwischen 10 und 120 s**

In dieser Abbildung enthalten sind die Fotografien der unterschiedlich behandelten Agarplatten nach einer Gesamtinkubationszeit von 24 h. Die schwarzen Quadrate stellen das Bestrahlungszentrum dar.

Die mit den schwarzen Quadraten gekennzeichneten Proben wurden mit Sauerstoff als Aktivgas, einem konstanten Gasdruck und einer konstanten Primärspannung plasmabehandelt. Dabei wurde die verwendete Bestrahlungsdauer zwischen 10 und 120 s variiert. Das rechte Bild beinhaltet die Negativkontrolle, welche nicht bestrahlt wurde. Die Koloniezahzahl und -größe wurde mit steigender Bestrahlungsdauer reduziert.



**Abbildung 33: Graphische Darstellung der Koloniegröße (grau dargestellt) und -anzahl (grün dargestellt) auf dem Kulturagar**

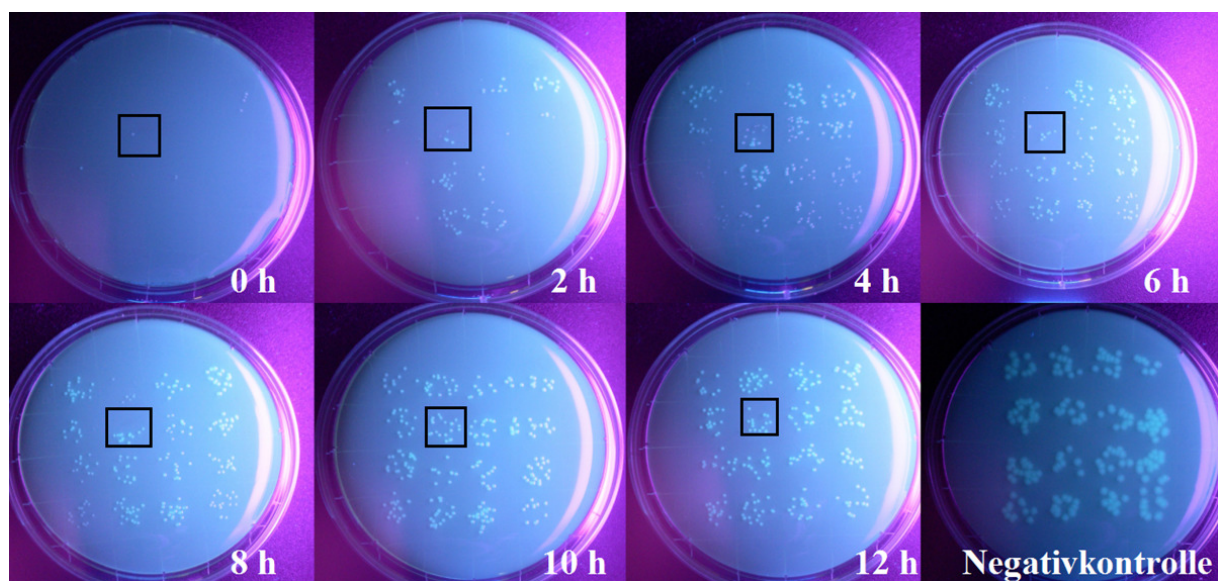
Die Anzahl der Kolonien und die Koloniegröße wurden bei der Sauerstoff-Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle reduziert. Mit steigender Bestrahlungsdauer wird sowohl die Koloniegröße als auch die Koloniezahzahl reduziert.

Die Bestrahlungsdauer nimmt einen Einfluss auf die Anzahl und Größe der Kolonien der *Pseudomonas fluorescens*. Mit steigender Bestrahlungsdauer sinkt die Koloniezahzahl. Bei der größten Bestrahlungszeit von 120 s sind nur zwei Kolonien auf dem Kulturagar gewachsen. Auf der Negativkontrolle hingegen sind 96 Kolonien gewachsen. Eine Bestrahlung von 60 s reduziert die



Kolonieanzahl um die Hälfte. Bei einer Bestrahlungszeit von 10 s wird die Koloniegröße reduziert, jedoch ist die Anzahl der Kolonien gleich mit der Negativkontrolle. Die Bestrahlungszeit nimmt auch Einfluss auf die Koloniegröße. Mit wachsender Bestrahlungszeit minimiert sich der Koloniedurchmesser. In der Negativkontrolle besitzen die Kolonien einen Durchmesser von 1,57 mm. Bei einer Bestrahlungsdauer von 10 s wurde der Koloniedurchmesser um 26% auf 1,17 mm abgesenkt. Eine Reduktion um 52% auf einen Durchmesser von 0,75 mm erfolgte bei der 60 s Bestrahlung. Mit einer Bestrahlungsdauer von 120 s konnte der Koloniedurchmesser um 60% auf einen Durchmesser von 0,63 mm minimiert werden.

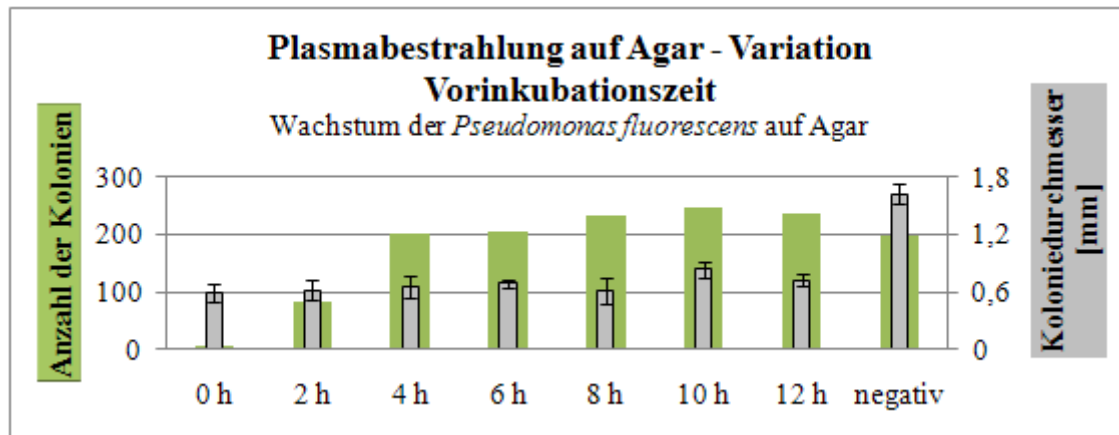
#### *Variation der Inkubationszeit*



**Abbildung 34: Variation der Vorinkubationszeit zwischen 0 und 12 h**

In dieser Abbildung dargestellt sind die Fotografien der unterschiedlich behandelten Agarplatten nach einer Gesamtinkubationszeit von 24 h. Die schwarzen Quadrate stellen das Bestrahlungszentrum dar.

Die mit 0 bis 12 h gekennzeichneten Proben wurden gleichbleibend mit einem Sauerstoff-Plasma behandelt. Dabei wurde die Vorinkubationszeit zwischen 0 und 12 h variiert. Die Negativkontrolle wurde nicht bestrahlt. Zu erkennen ist eine Reduktion der Kolonieanzahl je kürzer die Vorinkubationszeit ist. Auch die Koloniegröße wurde in allen bestrahlten Proben reduziert.



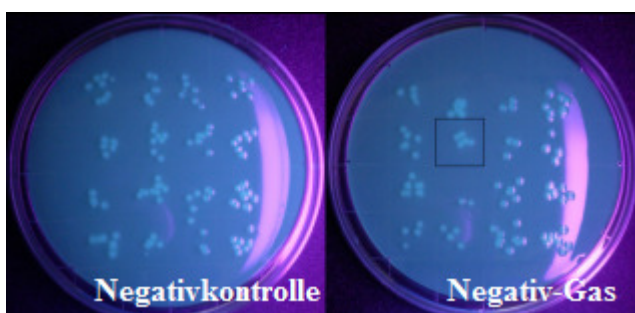
**Abbildung 35: Graphische Darstellung der Koloniegröße (grau dargestellt) und –anzahl (grün dargestellt) auf dem Kulturagar**

Die Koloniegröße wurde bei der Sauerstoff-Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle reduziert. Die Vorinkubationszeit nimmt keinen Einfluss auf die Koloniegröße. Die Koloniezahl ist von der Vorinkubationszeit abhängig.

Die Inkubationszeit vor der Bestrahlung beeinflusst deutlich die Anzahl der Kolonien. Bei einer direkten Bestrahlungsbehandlung der *Pseudomonas fluorescens* nach dem Beimpfen des Kulturagars können 96% der Keime abgetötet werden. Nach einer Inkubationszeit von 2 h werden nur noch 62% der Bakterien inaktiviert. Werden die Keime 4 h und länger vorinkubiert, ist keine Inaktivierung mehr möglich. Lediglich das Wachstumsverhalten wird verzögert. Die Koloniegröße wurde unabhängig von der Vorinkubationszeit um 48 bis 63% verringert.

#### Negativkontrolle Gas

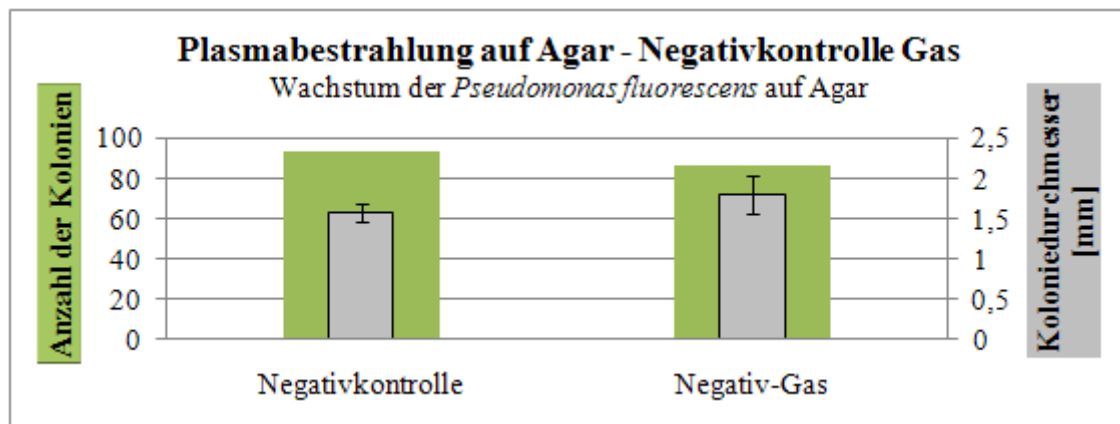
Um den Einfluss des Gasflusses auf die Probe zu untersuchen wurde die Probe „Negativ-Gas“ mit Sauerstoff und einem Gasdruck von 0,2 bar begast.



**Abbildung 36: Negativ-Gas-Kontrolle**

In dieser Abbildung dargestellt sind die Fotografien der unterschiedlich behandelten Agarplatten nach einer Gesamtinkubationszeit von 24 h.

Die mit „Negativ-Gas“ gekennzeichnete Probe auf der Abbildung 36 wurde mit Sauerstoff analog der Plasmabestrahlung mit 0,2 bar für 60 s begast. Dabei wurde keine Primärspannung angelegt. Lediglich der Sauerstoff wirkt auf die Probe ein. Die Negativkontrolle wurde nicht behandelt. Es ist kein Unterschied in der Koloniezahl oder –größe zwischen den Proben zu erkennen.

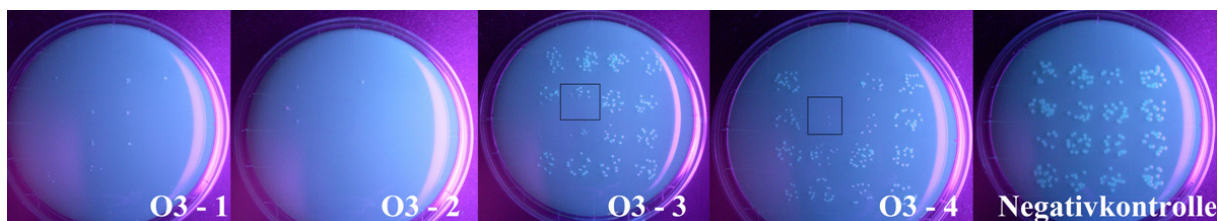


**Abbildung 37: Graphische Darstellung der Koloniegröße (grau dargestellt) und -anzahl (grün dargestellt) auf dem Kulturagar**

Die Negativkontrolle wurde nicht behandelt. Die Probe „Negativ-Gas“ wurde ohne Spannungszuschaltung mit einem Sauerstoff-Gasdruck von 0,2 bar behandelt.

Die Kolonienanzahl nahm bei der begasten Probe minimal um 7% ab. Die Koloniegröße der mit dem Gas behandelten Probe ist um 15% größer als die unbehandelte Probe. Die Abnahme der Koloniegröße liegt innerhalb der Standardabweichung von 15%.

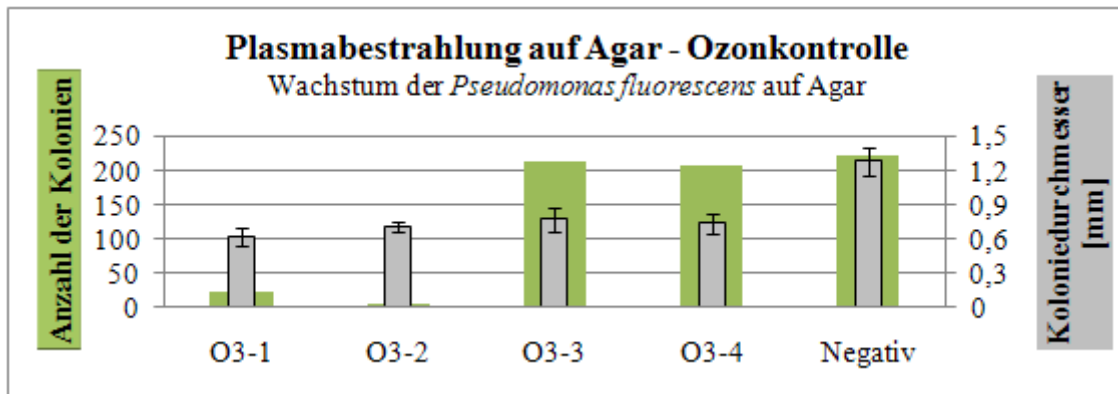
#### Ozon



**Abbildung 38: Ozonkontrolle**

In dieser Abbildung dargestellt sind die Fotografien der unterschiedlich behandelten Agarplatten nach einer Gesamtkubationszeit von 24 h.

Die Proben O3-3 und O3-4 wurden direkt mit einem Sauerstoffplasma bei einem Gasdruck von 0,2 bar und bei 200 V Primärspannung für 60 s bestrahlt. Dabei wurde bei der Probe O3-3 die Abzuganlage zugeschaltet und bei der Probe O3-4 abgeschaltet. Die Proben O3-1 und O3-2 wurden mit den gleichen Plasmametern wie Probe O3-3 und O3-4 behandelt, jedoch wurde der Ozondeckel eingesetzt und somit die optische und die Teilchenstrahlung gefiltert. Auf diese Proben wirkte nur das Ozon als Plasmameterein. Dabei wurde bei Probe O3-1 die Abzuganlage zugeschaltet und bei der Probe O3-2 abgeschaltet. Auf den Fotografien erkennt man eine stark reduzierte Anzahl an Bakterienkolonien der nur mit Ozon behandelten Proben.



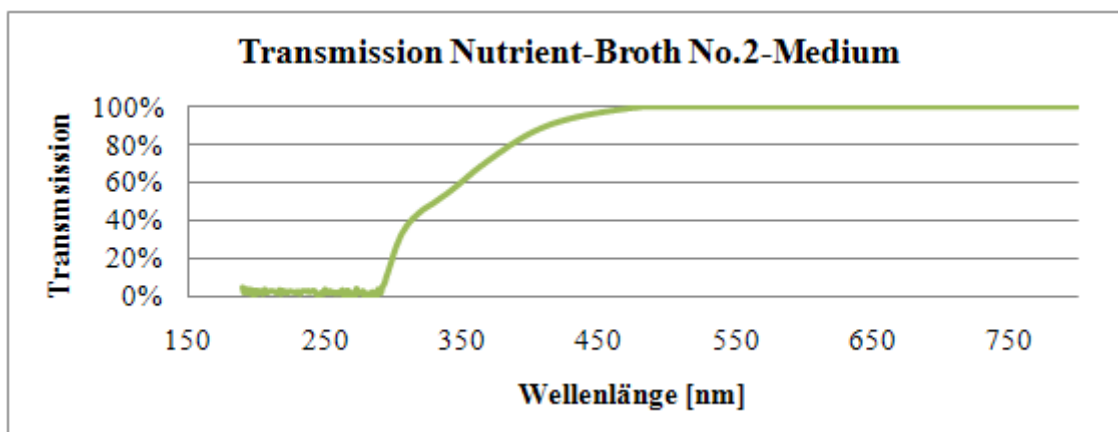
**Abbildung 39: Graphische Darstellung der Koloniegröße (grau dargestellt) und –anzahl (grün dargestellt) auf dem Kulturagar**

Die Proben O3-1 und O3-2 wurden mit Verwendung des so genannten Ozondeckels bestrahlt. Die Proben O3-3 und O3-4 wurden direkt bestrahlt. Die gefilterte Ozonbestrahlung mindert die Kolonienanzahl wesentlich stärker als die direkte, ungefilterte Bestrahlung.

Die Negativkontrolle wurde nicht behandelt. Auf die Proben O3-1 und O3-2 wirkte nur Ozon ein. Dabei wurde die Kolonienanzahl um 90 bis 97% reduziert. Bei den direkt bestrahlten Proben wurde die Kolonienanzahl lediglich um 4 bis 7% verringert. Die Reduktion des Koloniedurchmessers beträgt bei den nur mit Ozon behandelten Proben 45 bis 52% und bei den direkt bestrahlten Proben 39 bis 42%. Die Kolonienanzahl wurde zusätzlich über Ausschalten des Abzuges (Proben O3-2 und O3-4) verringert.

#### 4. 2. 2. Bestrahlung von *Pseudomonas fluorescens* als Zellsuspension

Vorversuch – Absorptionsspektrum des Kulturmediums Nutrient-Broth No.2

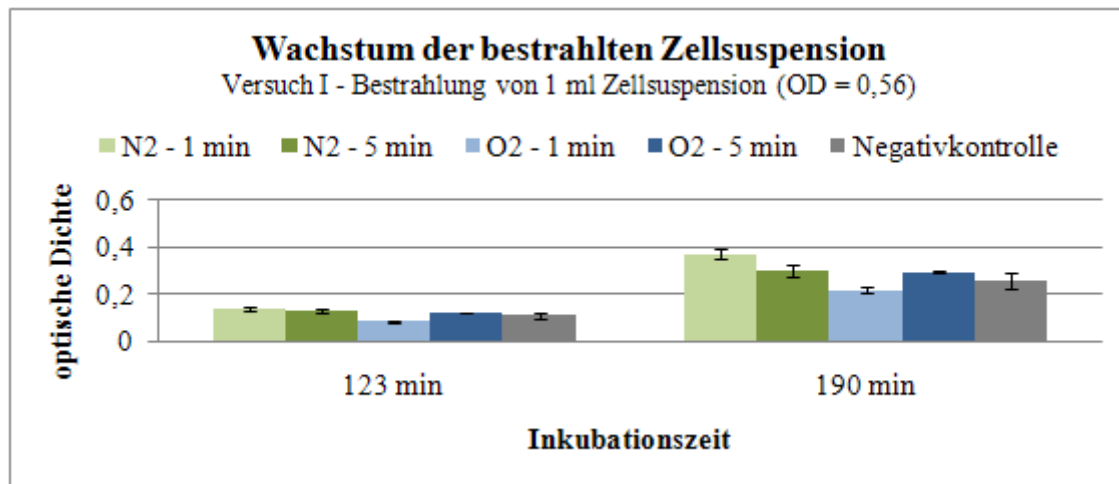


**Abbildung 40: Transmissionskurve des Kulturmediums Nutrient-Broth No.2**

In dem Diagramm dargestellt ist die Transmission in % des für die Bestrahlungsversuche verwendeten Kulturmediums in Abhängigkeit von der Wellenlänge der optischen Strahlung. Die optische Strahlung wird bis 300 nm vollständig absorbiert. Ab 480 nm ist das Medium vollständig transparent.

Die optische Strahlung wird im ultravioletten Strahlungsbereich teilweise absorbiert. Wellenlängen unter 300 nm werden vollständig absorbiert und für Wellenlängen zwischen 300 und 380 nm ist das Medium bis zu 77% transparent. Im sichtbaren Strahlungsbereich werden bis zu 23% der Strahlung unterhalb von 480 nm absorbiert. Ab einer Wellenlänge von 480 nm und im infraroten Strahlungsbereich ist das Kulturmedium vollständig transparent.

#### Versuch 1- Bestrahlung von 1 ml Zellsuspension

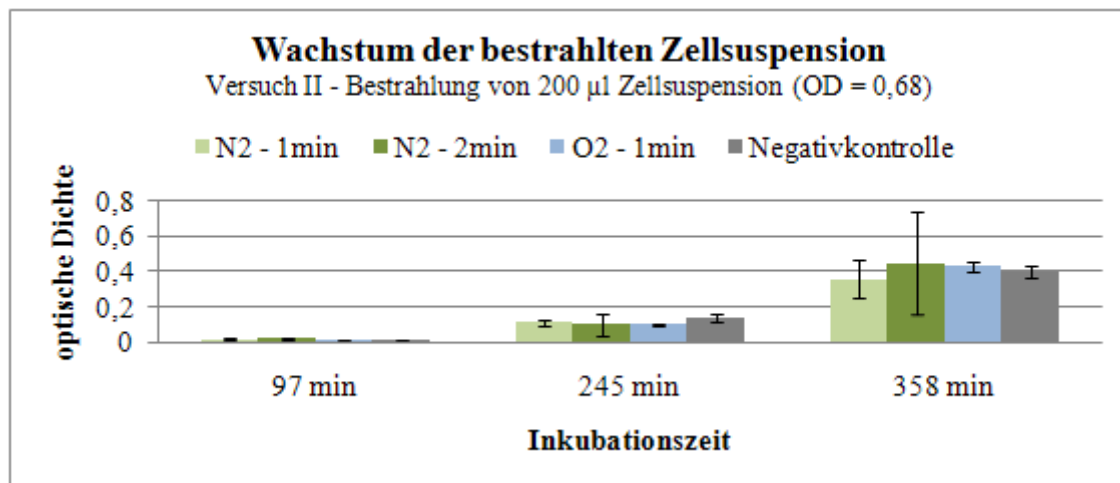


**Abbildung 41: Graphische Darstellung des Wachstums von *Pseudomonas fluorescens* anhand der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit**

Die bestrahlten Proben (grün und blau dargestellt) haben ähnlich der Negativkontrolle (grau) bereits nach 123 min Inkubation die optische Dichte von 0,1 überschritten. Auch nach 190 min ist keine Wachstumshemmung der bestrahlten Proben zu erkennen.

Im ersten Versuch bei einer Bestrahlung von 1 ml Zellsuspension mit einer optischen Dichte von 0,56 konnte das Wachstum der *Pseudomonas fluorescens* im Vergleich zur Negativkontrolle nicht gemindert werden. Unabhängig von der Behandlung erreichten die Proben nach 123 min eine optische Dichte von 0,08 bis 0,14.

## Versuch 2 – Bestrahlung von 200 µl Zellsuspension



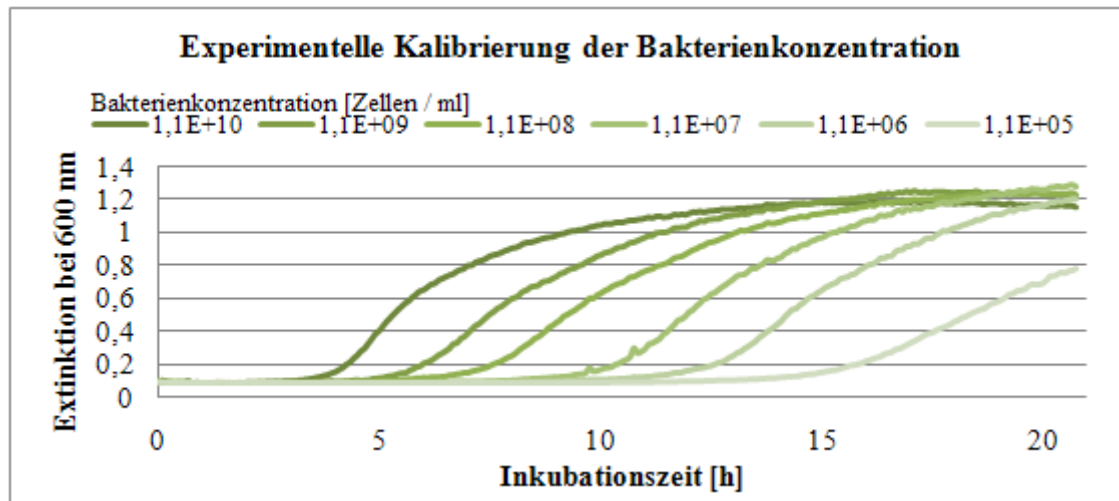
**Abbildung 42: Graphische Darstellung des Wachstums von den *Pseudomonas fluorescens* anhand der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit**

Die bestrahlten Proben (grün und blau dargestellt) überschreiten analog der unbehandelten Negativkontrolle nach 358 min eine optische Dichte von 0,2.

In einem zweiten Versuch wurde das bestrahlte Volumen der Zellsuspension verringert. Auch hier erreichten alle Proben der *Pseudomonas fluorescens* gleichmäßig und unabhängig ihrer Behandlung nach 245 min den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase. Nach 358 min besitzen die behandelten Proben eine optische Dichte von 0,36 bis 0,43 und sind damit der Negativprobe mit 0,40 gegenüber nicht in Ihrem Wachstum gehemmt.

### 4. 2. 3. Bestrahlung von *Pseudomonas fluorescens* auf Filterpapier

Experimentelle Kalibrierung der Bakterienkonzentration auf den zeitlichen Beginn der exponentiellen Wachstumsphase

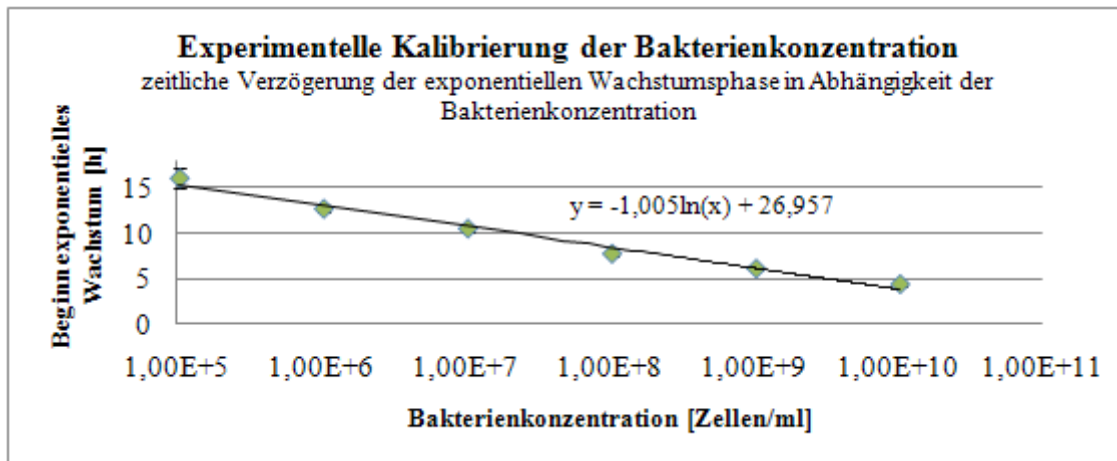


**Abbildung 43: Wachstumskurven einer 10er Verdünnungsreihe**

Die horizontale Achse gibt die Inkubationszeit wieder und die vertikale Achse stellt die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 600 nm dar. Die dunkelgrüne Kurve zeigt das Wachstum der unverdünnten Probe mit einer optischen Dichte von 0,67, welche einer Bakterienkonzentration von  $1,05 \times 10^{10}$  Zellen / ml entspricht. Je höher die Verdünnung ist, umso später erreicht die Probe die exponentielle Wachstumsphase mit einer Extinktion bei 600 nm von 0,2 bis 1.

Um die reduzierte Keimdichte zu bestimmen wurde eine dekadische Verdünnungsreihe hergestellt und das Wachstum dieser beobachtet. Die unverdünnte Probe mit einer optischen Dichte von 0,67 (dunkelgrün dargestellt) erreicht als erste die exponentielle Wachstumsphase nach 4,35 h. Die optische Dichte von 0,67 entspricht einer Bakterienkonzentration an *Pseudomonaden* von  $1,05 \times 10^{10}$  Zellen / ml. Die Verdünnungen erreichen die exponentielle Phase erst nach einer zeitlichen Verzögerung von 1,72 bis 11,69 h.





**Abbildung 44: zeitlicher Beginn der exponentiellen Wachstumsphase in Abhängigkeit der Bakterienkonzentration**

In diesem Diagramm wird das zeitliche Erreichen des Extinktionschwellwertes von 0,2 in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration dargestellt. Eine Konzentrationsminderung weist eine steigende zeitliche Verzögerung auf. Dabei ist die Konzentration exponentiell abhängig von der Zeitverzögerung.

Die Verdünnung und die resultierende Verzögerungszeit sind direkt voneinander abhängig. Je mehr *Pseudomonaden* sich in der Lösung befinden umso schneller wird die exponentielle Wachstumsphase erreicht. Der zeitliche Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (Überschreiten des Schwellwertes von 0,2) ist logarithmisch abhängig von der Anzahl der in der Probe befindlichen *Pseudomonaden*. Dabei gilt folgende Beziehung analog der in der Abbildung 44 dargestellten Regressionsgeraden:

$$t = -1,005 \cdot \ln(c) + 26,957$$

**Formel 15: Regressionsgerade**

mit c... Bakterienkonzentration in Zellen/ml  
t... Inkubationszeit bi der Absorptionsschwellwert von 0,2 überschritten wird

Anhand dieser Gleichung können von dem zeitlichen Wachstumsbeginn Rückschlüsse auf die Bakterienkonzentration der *Pseudomonaden* gezogen werden.

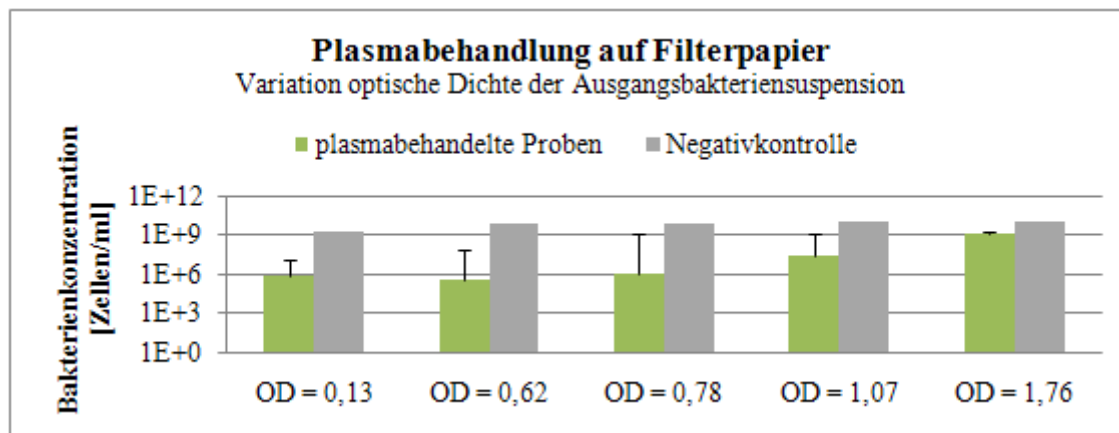
$$c = e^{\frac{26,957-t}{1,005}}$$

**Formel 16: Bakterienkonzentration in Abhängigkeit vom Beginn der exponentiellen Wachstumsphase**

Die Bakterienkonzentration ist abhängig vom Beginn der exponentiellen Wachstumsphase.



#### Variation der optischen Dichte der Ausgangsbakteriensuspension

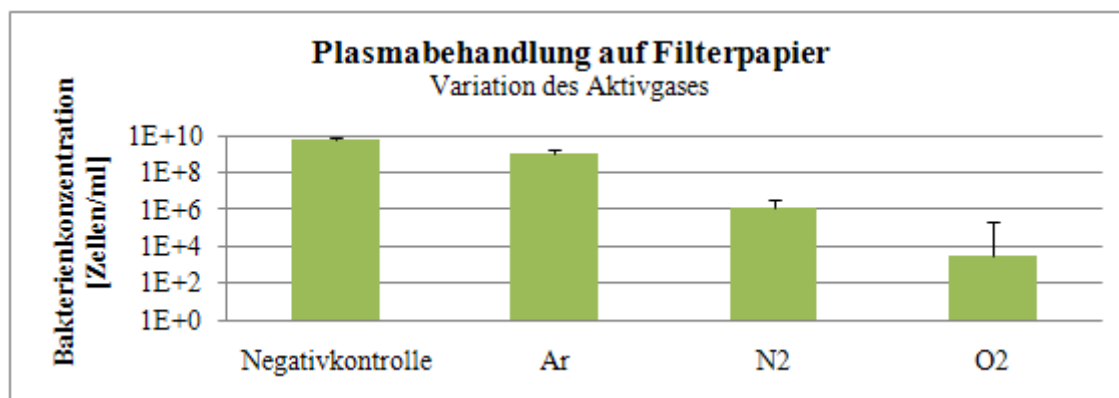


**Abbildung 45: Graphische Darstellung der Bakterienkonzentration Variation der optischen Dichte der Bakteriensuspension zur Beimpfung des Filters**

Dargestellt ist die Bakterienkonzentration bezogen auf die optischen Dichte der Bakteriensuspension, mit welcher die Filter beimpft wurden. Aus der zeitlichen Verzögerung wurde anhand der Formel 16 Bakterienkonzentration der jeweiligen Probe berechnet.

Die Proben mit einer optischen Dichte von 0,1; 0,6 und 0,8 wurden zu 99,9% inaktiviert. Wurde eine optische Dichte von über 1 verwendet konnte die Bakterienkonzentration maximal um 99,7% gesenkt werden. Die geringste Inaktivierung wurde bei der höchsten optischen Dichte von 1,8 mit 88,8% gemessen.

#### Variation des Aktivgases



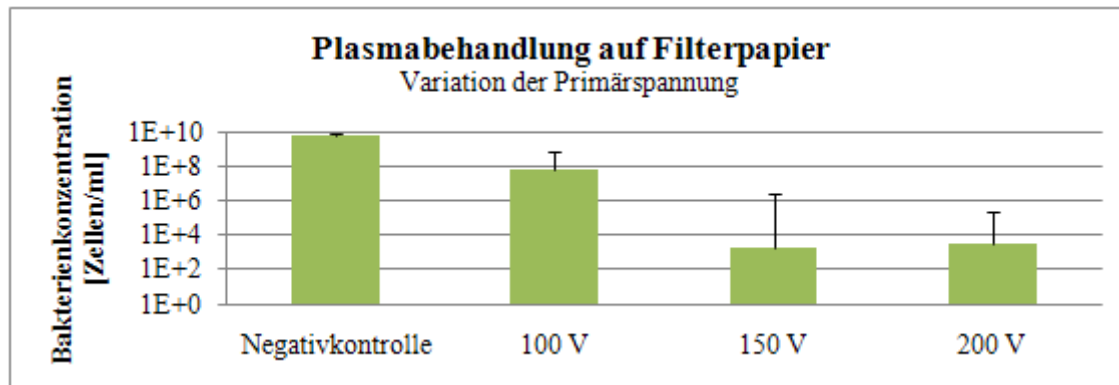
**Abbildung 46: Graphische Darstellung der Bakterienkonzentration bei Variation des Aktivgases**

Die Bakterienkonzentration wurde bei allen drei Aktivgasen gemindert. Bei Verwendung von Sauerstoff als Aktivgas wurden die meisten Bakterien inaktiviert.

Bei der Sauerstoff-Plasmabehandlung reduzierte sich die Bakterienkonzentration *Pseudomonas fluorescens* von  $6,23 \times 10^9$  Zellen / ml auf  $3,15 \times 10^3$  Zellen / ml. Dies entspricht einer Inaktivierung von 99,99994%. Die Stickstoff-Plasmabehandlung minimierte die Konzentration der *Pseudomonaden*

um 99,98% auf  $1,36 \times 10^6$  Zellen / ml. Mit einer Bakterienreduktion auf  $1,11 \times 10^9$  Zellen / ml inaktivierte das Argon-Plasma die *Pseudomonaden* zu 82%.

#### Variation der Primärspannung

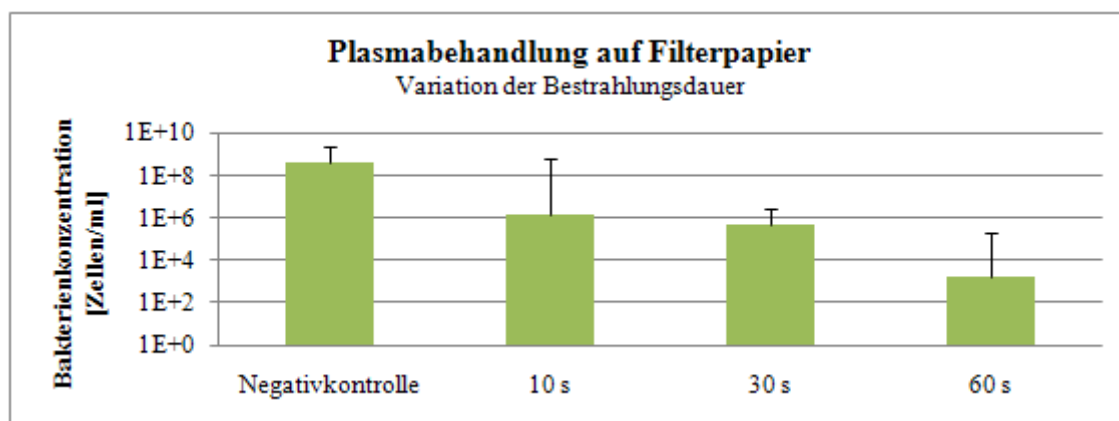


**Abbildung 47: Graphische Darstellung der Bakterienkonzentration bei Variation der Primärspannung**

Die Bakterienkonzentration wurde bei der Plasmabehandlung gemindert. Die mit einer Primärspannung von 150 und 200 V behandelten Proben wurden stärker inaktiviert als die mit einer Primärspannung von 100 V behandelten Proben.

Bei der Sauerstoff-Plasmabehandlung mit einer Primärspannung von 100 V (dies entspricht einer Sekundärspannung von 4 kV) reduzierte sich die Bakterienkonzentration *Pseudomonas fluorescens* von  $6,23 \times 10^9$  Zellen / ml auf  $5,99 \times 10^7$  Zellen / ml. Dies entspricht einer Inaktivierung von 99,04%. Die 150 V-Plasmabehandlung minimierte die Konzentration der *Pseudomonaden* um 99,99997% auf  $1,77 \times 10^3$  Zellen / ml. Mit einer Bakterienreduktion auf  $3,15 \times 10^3$  Zellen / ml inaktivierte die Plasmabehandlung mit 200 V Primärspannung (entspricht 8 kV Sekundärspannung) die *Pseudomonaden* zu 99,99995%.

#### Variation der Bestrahlungsdauer

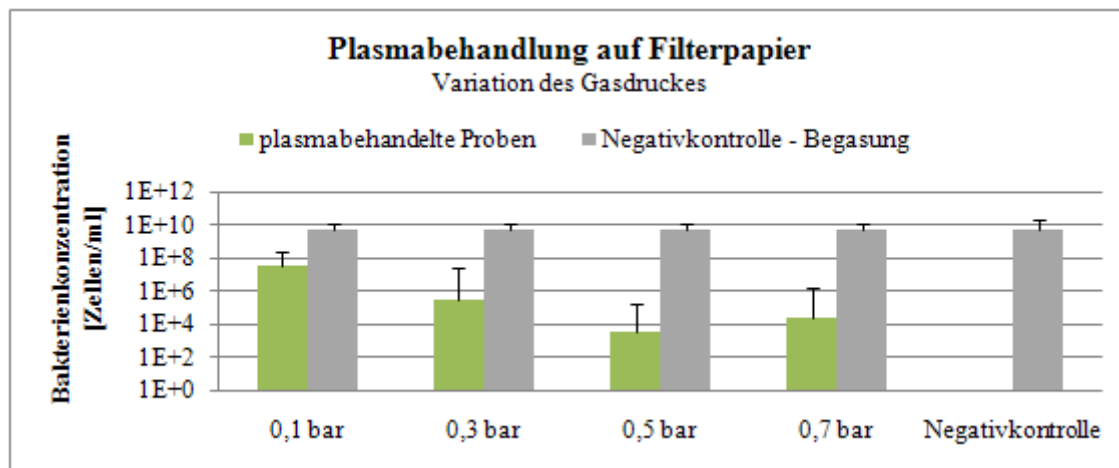


**Abbildung 48: Graphische Darstellung der Bakterienkonzentration bei Variation der Bestrahlungsdauer**

Je länger das Plasma auf die Proben einwirkte umso mehr Keime wurden inaktiviert.

Bei der Sauerstoff-Plasmabehandlung von 10 s mit einer Primärspannung von 200 V reduzierte sich die Bakterienkonzentration der *Pseudomonas fluorescens* von  $3,77 \times 10^8$  Zellen / ml auf  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Dies entspricht einer Inaktivierung von 99,6%. Die 30 s-Plasmabehandlung reduzierte die Konzentration der *Pseudomonaden* um 99,87% auf  $4,9 \times 10^5$  Zellen / ml. Mit einer Bakterienreduktion auf  $1,55 \times 10^3$  Zellen / ml inaktivierte die Plasmabehandlung mit einer Bestrahlungsdauer von 60 s die *Pseudomonaden* zu 99,9996%.

#### Variation des Gasdruckes



**Abbildung 49: Graphische Darstellung der Bakterienkonzentration bei Variation des Gasdruckes**

Die Inaktivierung der Bakterienanzahl steigt mit dem Gasdruck. Die mit einem Gasdruck ohne Spannungszuschaltung behandelten Proben weisen keine Inaktivierung auf.

Bei einer Sauerstoff-Plasmabehandlung mit einem Gasdruck von 0,1 bar reduzierte sich die Bakterienkonzentration *Pseudomonas fluorescens* von  $4,93 \times 10^9$  Zellen / ml auf  $3,73 \times 10^7$  Zellen / ml. Dies entspricht einer Inaktivierung von 99,24%. Die 0,3 bar-Plasmabehandlung minderte die *Pseudomonadenkonzentration* um 99,995% auf  $2,65 \times 10^5$  Zellen / ml. Mit einer Bakterienreduktion auf  $2,92 \times 10^3$  Zellen / ml inaktivierte die Plasmabehandlung mit Gasdruck von 0,5 bar die *Pseudomonaden* zu 99,99994%. Bei Verwendung eines Gasdruckes von 0,7 bar minimierte sich die Bakterienkonzentration um 99,9995% auf  $4,63 \times 10^4$  Zellen / ml. Die als Negativkontrollen begasten Proben ohne Spannungszuschaltung besaßen eine Bakterienkonzentration von  $4,52 \times 10^9$  bis  $4,88 \times 10^9$  Zellen / ml und wurden somit zu 8% inaktiviert.

## 5. Diskussion

### *Charakterisierung der Plasmaflamme*

Abhängig vom eingesetzten Aktivgas werden unterschiedliche Wellenlängen im Plasma emittiert.

Argon als Aktivgas emittiert vorwiegend im roten bis infraroten Spektralbereich. Die Emissionsmaxima des Stickstoff-Plasmas liegen im ultravioletten Strahlungsbereich. Das Sauerstoff-Plasma emittiert bei 242; 517; 777; und 981 nm. Die größten Intensitäten von bis zu 305 counts / ms wurden bei der Verwendung von Argon als Aktivgas gemessen. Wesentlich geringere Strahlungsintensitäten besitzt das Spektrum der Stickstoff-Plasmaflamme mit 25 counts / ms. Das geringste optische Spektrum sowohl in der Anzahl der emittierten Wellenlängen (4 Wellenlängen) als auch in der maximalen Strahlungsintensität (maximal 2 counts / ms) weist das Sauerstoff-Plasma auf. Die Unterschiede zwischen den Strahlungsintensitäten im Stickstoff- und im Argonplasma lassen sich auf die emittierten Wellenlängen zurückführen. Nach  $E = h \cdot f$  besitzen die Photonen in niedrigeren Wellenlängenbereich eine größere Energie [Bergmann, 1992]. Das Argonplasma emittiert im energetisch geringeren Rot- bis Infrarot-Bereich, während das Stickstoffplasma im energetisch höheren ultravioletten bis blauen Bereich emittiert. Dementsprechend sind die gemessenen Intensitäten im Stickstoffplasma geringer als in der Argonplasmaflamme. Das Sauerstoffplasma weist die geringsten Strahlungsintensitäten auf. Die optische Strahlung des Sauerstoffplasmas wird zum Teil vom Ozon absorbiert. Zum Beispiel emittiert ein dreifach angeregtes O-Ion UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 159 nm [NIST, 2012]. Jedoch wird optische Strahlung unter 242 nm von O<sub>2</sub>-Molekülen und Ozon absorbiert [Reinelt, 2008]. Desweiteren ist die relative Sensitivität des Faserspektrometers unterhalb 300 nm sehr gering. Wellenlängen unter 300 nm können nur bei entsprechend hoher Energie detektiert werden [avantes, 2012].

Die Intensität des Emissionsspektrums ist abhängig von der Primärspannung und dem Gasdruck. Bei Argon halbiert sich die Intensität, wenn der Gasdruck von 0,1 bar auf 0,2 bar erhöht wird. Zwischen 0,2 bar und 1 bar bleibt die Strahlungsintensität nahezu konstant. Bei Verwendung von Stickstoff und Sauerstoff als Aktivgas ist ein wesentlich höherer Gasdruck 0,8 bar notwendig. In den biologischen Versuchen konnte maximal mit einem Gasdruck von 0,2 bar auf dem Kulturagar gearbeitet werden, da ansonsten der Agar zu stark verformt worden wäre.

Auch bei Variation der Primärspannung verhalten sich das Stickstoff- und Sauerstoffplasma ähnlich. Die Stickstoff-Plasmaflamme besitzt ihr Intensitätsmaximum bei einer Primärspannung von 70 V (entspricht einer Sekundärspannung von 2,8 kV) und verringert sich bereits bei Abweichung von

10 V um die Hälfte. Das Sauerstoffplasma braucht eine Mindestprimärspannung von 60 V, um zu zünden, und besitzt ihr Intensitätsmaxima bei 100 V (entspricht 4 kV Sekundärspannung). Die Argon-Plasmaflamme hingegen besitzt keine Intensitätsmaxima in Abhängigkeit von der Primärspannung.

Die Teilchenstrahlung wurde anhand des optischen Spektrums charakterisiert. Bei Argon als verwendetem Aktivgas entstammen die strahlungsintensivsten Wellenlängen einfach angeregten Ionen. Im Stickstoff-Plasma wurden vorwiegend mehrfach (drei- bis fünffach) angeregte Ionen detektiert. Die Sauerstoff-Plasmaflamme enthält einfach und zweifach angeregte Ionen. Eine genaue Untersuchung der auf die Bakterien einwirkenden Teilchenenergie konnte im Rahmen dieser Masterarbeit nicht durchgeführt werden, da diese Teilchenenergien sehr gering sind und mit herkömmlichen Messmethoden nicht detektierbar sind. Auch die Aufnahme einer Lichtbogenkennlinie war aus sicherheitstechnischen Gründen nicht möglich.

Die Ozongenerierung spielt für den Inaktivierungsprozess der *Pseudomonas fluorescens* eine große Rolle. Obwohl die ozongenerierende Wellenlänge 242 nm in allen drei optischen Spektren der Aktivgase in gleicher Intensität erscheint, ist die Ozonkonzentration bei dem Stickstoff- und Sauerstoffplasma um das achtfache größer als im Argonplasma. Bei Verwendung von Stickstoff und Sauerstoff als Aktivgas wird in gleichen Maßen Ozon generiert. Die hohe Ozonkonzentration des Sauerstoffplasmas lässt sich auf die hohe Anzahl an Sauerstoffmolekülen im Plasmaprozess zurückführen. Da viele O<sub>2</sub>-Moleküle vorhanden sind, können diese auch in Ozon umgewandelt werden. Die Ozonkonzentration im Stickstoffplasma ist ähnlich hoch wie die Konzentration im Sauerstoffplasma. Dies lässt sich auf die Reaktionsfreudigkeit des Stickstoffmoleküls und die starke Generierung optischer Strahlung unter 420 nm zurückführen. Bei Wellenlängen im UV-Bereich und nahe dem UV-Bereich werden andere weitere sauerstoffenthaltende Moleküle, wie zum Beispiel CO<sub>2</sub>, gespalten [Hollemann, 1995]. Weiterhin ist Stickstoff wesentlich reaktiver als das Edelgas Argon und dient somit einem besseren Energietransport. Bei Verwendung von Stickstoff und Sauerstoff als Aktivgas wird eine Ozonkonzentration von 1290 µg / m<sup>3</sup> nach 30 s Plasmabestrahlung erreicht.

#### *Plasmabehandlungsverfahren von Pseudomonas fluorescens*

Eine keimreduzierende Wirkung der Plasmabestrahlung konnte sowohl auf der Agar-Oberfläche als auch auf den Nitrocellulose-Filtern nachgewiesen werden.

Die Bestrahlung auf Kulturagar erwies sich als sehr gute Methode, um eine Keimreduktion nachzuweisen. Dabei konnte die Koloniezahl und -größe je nach Variation der Plasmaparameter verändert werden. Als Parametervariation zeigten die Wahl des Aktivgases, der Bestrahlungsdauer und die Vorinkubationszeit eine große Bedeutung.

Eine Inaktivierung von *Pseudomonas fluorescens* als Zellsuspension war nicht möglich. Dies ist auf die oberflächliche Wirkung des Plasmas zurückzuführen. Die Teilchenstrahlung und das Ozon als Gas können nicht in die Zellsuspension eindringen. Darüber hinaus wurde in dem Vorversuch zur Bestimmung des Absorptionsspektrums von Nutrien-Broth2-Medium bewiesen, dass die UV-Strahlung unter 300 nm absorbiert wird und lediglich die optische Strahlung im visuell sichtbaren und infraroten Bereich das Medium vollständig durchdringen kann. Die *Pseudomonaden* werden vom umgebenden Medium vor den schädlichen Wirkungen der UV-Strahlung, des Ozons und der Teilchenstrahlung geschützt.

Die Bestrahlung der *Pseudomonaden* auf Filterpapier erwies sich mit einer ermittelten Inaktivierung von bis zu 99,9999% als sehr effiziente Methode. Vergleichsweise beträgt der D-Wert, bei welchem 90% der Keime inaktiviert werden, für *Pseudomonaden* bei einer Temperatur von 73,3 °C 0,52 s [Kessler, 1988]. Mit der in diesen Versuchen gezeigten Methode konnten bereits innerhalb 10 s 99,6% der *Pseudomonas fluorescens* inaktiviert werden.

Zudem konnte mit dieser Methode auch ein solcher Inaktivierungsfaktor anhand der verzögerten exponentiellen Wachstumsphase ermittelt werden. Durch die Behandlung der *Pseudomonaden* auf einer Nitrocellulosemembran können diese nach der Bestrahlung von der Membran abgespült und zur Immobilisierung weiterverwendet werden.

#### *Einfluss der einzelnen Plasmaeigenschaften auf die Inaktivierung von Pseudomonas fluorescens*

Eine Basenschädigung der DNA durch ultraviolette Strahlung tritt bei einer Wellenlänge von unter 260 nm auf [Hellweg, 2001; Pfützner, 2003]. Bei allen drei Aktivgasen wurde nur eine Wellenlänge 242 nm mit sehr geringen Intensitäten (3 counts / ms) unterhalb dieser Grenze detektiert. Dementsprechend ist die in diesem Plasmaprozess generierte UV-Strahlung zu intensitätsschwach, um die Inaktivierung gravierend zu beeinflussen.

Die gemessenen Ozonwerte im Plasmaprozess liegen bei der Verwendung von Stickstoff und Sauerstoff nach einer Bestrahlungszeit von 30 s bei 1290 µg / m<sup>3</sup>. Bei Argon als Aktivgas wird ebenfalls Ozon generiert, jedoch mit 150,5 µg / m<sup>3</sup> nach 30 s Bestrahlungszeit, wesentlich weniger als bei Sauerstoff und Stickstoff. In den Experimenten wurden mehr *Pseudomonas fluorescens* bei der Verwendung von Sauerstoff und Stickstoff als Aktivgas inaktiviert als bei Argon. Dementsprechend ist die Ozonkonzentration maßgebend für den Inaktivierungsprozess. Weiterhin wurde in einem Ozontest auf Kulturagar der Einfluss des Ozons untersucht. Dazu wurden UV-Strahlung und Teilchenstrahlung mittels des Ozondeckels gefiltert. Bei Verwendung dieses Ozondeckels wurden mehr *Pseudomonaden* auf der Agar-Oberfläche eliminiert als bei der direkten Bestrahlung. Dieses

Ergebnis ist vermutlich auf die durch den Deckel hervorgerufene Ozonanreicherung auf der Agaroberfläche zurückzuführen. Es wurde anhand der Variation des Aktivgases und dem Ozontest mit dem Ozondeckel eindeutig nachgewiesen, dass die Ozongenerierung innerhalb des Plasmaprozesses als zellschädigender Faktor auf *Pseudomonas fluorescens* einwirkt.

Der Einfluss der Teilchenstrahlung konnte anhand der durchgeführten Experimente nicht erfasst werden. Auffällig ist, dass bei Verwendung von Stickstoff und Sauerstoff als Aktivgas die gleiche Ozonkonzentration generiert wird. Jedoch ist sowohl bei der Bestrahlung auf Kulturagar als auch auf Filtermembranen eine höhere Effizienz in der Keiminaktivierung bei Verwendung eines Sauerstoffplasmas nachgewiesen worden. Dies könnte sich auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Teilchenstrahlung zurückführen lassen, da die optische Strahlung des Stickstoffplasmas wesentlich höhere Intensitäten als das Sauerstoffplasma aufweist.

#### *Einfluss der Plasmavariationen auf die Inaktivierung von Pseudomonas fluorescens*

Das Plasma wurde in seinen Eigenschaften anhand der Wahl des Aktivgases, der Primärspannung und des Gasdruckes variiert.

Sowohl bei der Bestrahlung der *Pseudomonaden* auf Kulturagar als auch auf Filterpapier wurde der Einfluss des Aktivgases nachgewiesen. In beiden Versuchsmethoden erwies sich die Sauerstoffplasmabehandlung als die effizienteste. Auch mit der Stickstoffplasmabehandlung wurden gute Ergebnisse erzielt. Mit der Argonplasmabehandlung wurde die geringste Inaktivierung erzielt. Das Sauerstoff- und Stickstoffplasma besitzt einen sehr großen Inaktivierungsfaktor von bis zu 99,9999% auf Filterpapier.

Die Variation der Primärspannung beeinflusste bei der Plasmabestrahlung auf Kulturagar den Inaktivierungsprozess nur geringfügig. Dabei konnte keine Spannung festgestellt werden, welche den Inaktivierungsprozess signifikant förderte. Bei der Plasmabehandlung auf Filterpapier konnte jedoch ein bedeutsamer Unterschied zwischen der Bestrahlung mit 100 V und der Bestrahlung mit 150 bzw. 200 V festgestellt werden. Bei einer Behandlung mit 100 V konnten lediglich 99,04% der *Pseudomonaden* inaktiviert werden, wohingegen bei einer Bestrahlung mit 150 und 200 V eine Inaktivierung von 99,99995 und 99,99997% möglich war. Der Einfluss der Primärspannung lässt sich auf die Teilchenstrahlung zurückführen, da die Ozongenerierung unabhängig von der Primärspannung ist und das optische Spektrum das Intensitätsmaximum bei 100 V besitzt.

Der Einfluss des Gasdruckes als Plasmaparameter konnte nur mit der Filterbestrahlungsmethode beurteilt werden, da bei einem höheren Gasdruck auf dem Kulturagar die Agaroberfläche zu sehr

verformt worden wäre. Mit der Bestrahlung der Filtermembranen mit Variation des Gasdruckes konnte festgestellt werden, dass mit Druckerhöhung von 0,1 bar zu 0,3 bar und zu 0,5 bar auch mehr *Pseudomonaden* inaktiviert werden konnten. Die mit 0,7 bar bestrahlte Probe verhält sich ähnlich wie die mit 0,5 bar bestrahlte. Beim Einsatz des Sauerstoffplasmas wurde eine Intensitätssteigerung der optischen Strahlung bei Erhöhung des Gasdruckes von 0,1 auf 0,8 bar nachgewiesen. Ähnlich der Intensitätsänderung der optischen Strahlung steigt die Inaktivierung mit dem Gasdruck. Die Gasströmung ohne Plasmazuschaltung hatte einen geringfügigen Einfluss von 8% auf die Inaktivierung.

Die Bestrahlungsdauer ist ein maßgebender Inaktivierungsparameter. Sowohl auf Kulturoberfläche als auch auf der Filtermembran konnte eine steigende Inaktivierung mit steigender Bestrahlungsdauer nachgewiesen werden. Je länger *Pseudomonas fluorescens* der Plasmabestrahlung ausgesetzt waren, um so mehr der *Pseudomonaden* wurden inaktiviert, da die Ozonkonzentration während des Prozesses ansteigt und auch mehr geladene Teilchen auf die Zellen einwirken können.

#### *Einfluss des Wachstumsstadiums von Pseudomonas fluorescens auf den Inaktivierungsprozess*

In der Filterbestrahlungsmethode zeigt sich eine Inaktivierungsabhängigkeit von der Bakteriendichte auf der Filtermembran. Wurde eine optische Dichte der Bakteriensuspension von 0,1 bis 0,8 verwendet, konnten 99,9% der *Pseudomonaden* inaktiviert werden. Liegt die optische Dichte bei 1,8, können nur noch 88,8% inaktiviert werden. Die *Pseudomonaden* befinden sich bis zu einer optischen Dichte von 1 in einem exponentiellen Wachstumsprozess und sind dabei besonders strahlungsempfindlich da viele Zellteilungen stattfinden [Volkmer, 2007].



## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Bakterien der Spezies *Pseudomonas fluorescens* mit Plasmabestrahlung inaktiviert. Dabei wurde die Plasmastrahlung physikalisch untersucht und die für eine Inaktivierung förderlichen Parameter des Plasmagenerators bestimmt.

Innerhalb der Experimente wurde das Plasma auf UV-Strahlung, Ozonkonzentration und Teilchenstrahlung charakterisiert. Die höchsten Intensitäten der UV-Strahlung wurden im Stickstoffplasma detektiert. Das Argonplasma induziert eine Strahlung im sichtbaren roten bis infraroten Bereich. Sauerstoff als Aktivgas weist keine hohen optischen Strahlungsintensitäten auf. Die größte Ozonkonzentration wurde im Stickstoff- und Sauerstoffplasma gemessen. Im Argonplasma wurden vorwiegend einfach angeregte Ionen detektiert, während im Stickstoff- und Sauerstoffplasma überwiegend mehrfach angeregte Ionen detektiert wurden.

In den biologischen Experimenten konnte eine inaktivierende Wirkung des Plasmas auf Mikroorganismen sowohl auf Kulturagar als auch auf Filtermembranen nachgewiesen werden. Dabei erwies sich die Verwendung von einem Sauerstoffplasma mit einer Primärspannung von 150 bis 200 V als wirkungsvollste Inaktivierungsmethode. Bei Verwendung dieser Plasmaparameter konnten bereits nach 10 s 99,6% der *Pseudomonaden* inaktiviert werden.

Die Entwicklung der Bestrahlungsmethodik von *Pseudomonas fluorescens* auf Nitrocellulosemembranen erwies sich als gut quantifizierbar mit der Möglichkeit zur anschließenden Weiterbehandlung der bestrahlten Bakterien. Nach der Plasmabehandlung können die Keime vom Filterpapier abgelöst und in Medium aufgenommen werden. In weiterführenden Versuchen kann anschließend die Qualität der Zellproteine überprüft werden.

In weiteren Versuchen kann mit einer Untersuchung der Proteinqualität auch die genaueren zellbiologischen Wirkungen des Plasmas untersucht und nachgewiesen werden. So bietet sich die Argonplasmabestrahlung an, da bei diesem Behandlungsverfahren die geringste Ozonkonzentration generiert wird, um den Einfluss der Teilchenstrahlung zu untersuchen.

Zur Proteinanalyse bietet sich die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese an. Mit dieser Methode werden die Proteine isoliert und, im Gegensatz zur Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, in ihrer nativen, gefalteten Form untersucht. In einer anschließenden Untersuchung mittels Western Blot können durch Verwendung monoklonaler Antikörper, welche

gezielt an einem spezifischen Strukturepitop binden, native Proteine nachgewiesen werden [Schägger, 1991].

Mit der Massenspektrometrie können anhand von Fraktionsmustern Rückschlüsse auf einzelne strukturelle Merkmale von Proteinen gezogen werden [Zhang, 1994].

Eine vollständige Untersuchung der Proteinstruktur wäre mit der Röntgenkristallstrukturanalyse möglich [Kendrew, 1958].

Wurde mit der Proteinanalyse eine Strukturhaltung der zellspezifischen Proteine nachgewiesen, können Tiere mit den plasmainaktivierten Bakterien immunisiert werden. Diese bilden dann Antikörper gegen den gesamten Zellkomplex. Dabei werden Strukturepitope gebildet, da die Proteine während der Immunisierung der Tiere im nativen Zustand vorliegen.

Anschließend wird das Blut der Tiere aufgereinigt und ein Serum mit polyklonalen Antikörpern kann hergestellt werden.

## 7. Anhang

**Tabelle A 1: Materialien für den Aufbau der Einhausung und Halterungen**

Bezeichnung	Hersteller	Beschreibung
OWIS-Schrittmotoren	OWIS GmbH	Schrittmotoren zur Probenpositionierung
Plexiglas	Modulor	Einhausung der PLAGE
Boschprofile	Rexroth	Halterung Plasmakopf, Probentisch und Gehäuse
Schraubenmaterial	Rexroth, OWIS GmbH	Befestigungsmaterial
Silikonschläuche	Roth	Gasleitung
Silikonschlauchverbinder	Roth	Gasleitung
Polyoxymethylen (POM)		Probentischmaterial

**Tabelle A 2: Material für den Aufbau des Plasmakopfes**

Bezeichnung	Hersteller	Beschreibung
Aluminiumsilikat	Final Materials	Plasmakopf
Schraubenmaterial	Rexroth, OWIS GmbH	Befestigungsmaterial
Silikonschläuche	Roth	Gasleitung
Silikonschlauchverbinder	Roth	Gasleitung

**Tabelle A 3: Materialien zur Systemerweiterung**

Bezeichnung	Hersteller	Beschreibung
Laserpointer JLP-02-B	LightVision Technologies	Projektion eines Positionierungspunktes
optische Faser HPCS400UVT	LEONI	Strahlungsübertragung des Laserpointers auf die Probe
HD PRO Webcam C910	LogiTech	Kontrolle der Positionierung von unten
Digitale Mikroskop-Kamera DigiMirco 2.0 Sclae	dnt	Kontrolle der Positionierung von oben
Polyoxymethylen (POM)		gefräste Probentische

**Tabelle A 4: Geräte für die Spannungsversorgung**

Bezeichnung	Hersteller	Beschreibung
Schaltstelltrafo LSS 010	RFT	Regelung Spannungsversorgung
Neon Transformator 10.000/50Pe, 275W/2,5A	F.A.R.T.	Spannungsverstärkung

**Tabelle A 5: Chemikalien zur Bakterienkultivierung**

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller	Lot-Nr. / Charge
Agar für die Molekularbiologie	A3477,0500	Applichem	P000978
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Molekularbiologie	A994.1	Roth	481179586
Glycerin wasserfrei für die Molekularbiologie	A2926,0500	Applichem	0Q003059
King's B-Agar (Basis) nach EN 12780		Sifin	3341209
Nutrient Broth No.2	70123	Fluka	0001434621

**Tabelle A 6: Geräte zur Bakterienkultivierung**

Gerät	Modelnummer	Hersteller
BioPhotometer	6131 031 180	Eppendorf
FLUOstar Omega Plattenreader	S/N 415 – 1319	BMG Labtech
Inkubator	9010 – 0088 BD 115	Binder
Innova® Tischinkubationsschüttler	Innova 40	New Brunswick Scientific
Transportables UV-Licht 365 nm	AM 12 750	Ambion
Zentrifuge Avanti®	J-26XP	Beckman Coulter™

**Tabelle A 7: detektierte Wellenlängen des Argon-Plasmas mit Intensität und Halbwertsbreite**

zentrale Wellenlänge/ nm	maximale Intensität / (counts/ms)	Halbwertsbreite / (nm)
242	3	< 1
308	6	1
309	7	2
336	2	1
337	3	1
358	2	2
416	3	1
420	3	1
517	3	1
696	133	1
707	43	1
715	5	1
727	27	1
738	55	1
750	63	1
751	52	1
763	305	1
772	141	1
795	66	1
801	39	1
802	53	1
810	64	< 1

zentrale Wellenlänge/ nm	maximale Intensität / (counts/ms)	Halbwertsbreite / (nm)
811	163	< 1
827	68	1
841	51	1
843	54	2
852	23	1
867	3	1
912	72	1
922	11	1
966	8	1
981	2	< 1

Tabelle A 8: detektierte Wellenlängen des Stickstoff-Plasmas mit Intensität und Halbwertsbreite

zentrale Wellenlänge/ nm	maximale Intensität / (counts/ms)	Halbwertsbreite / (nm)
242	3	< 1
313	2	2
316	5	2
337	25	2
353	5	3
357	17	1
371	2	2
373	2	1
375	4	2
380	8	2
399	3	1
406	2	3
500	4	3
517	3	<1
981	2	<1

Tabelle A 9: detektierte Wellenlängen des Sauerstoff-Plasmas mit Intensität und Halbwertsbreite

zentrale Wellenlänge/ nm	maximale Intensität / (counts/ms)	Halbwertsbreite / (nm)
242	2	< 1
517	2	< 1
777	2	1
845	1	1
981	2	< 1

**Tabelle A 10: detektierte Ionen und deren Elektronenkonfigurationen und Elektronenübergangsenergie im Argon-Plasma**

Optisches Spektrum		Informationen aus der Datenbank [NIST, 2012]			
gemessene Wellenlänge / nm	gemessene Intensität / (counts/ms)	Ion	Ritz-Wellenlänge / nm	$\Delta E = E_k - E_i = h \cdot \nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Elektronenkonfiguration
242	3	Ar II	242,045573	41301,9872	3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)4p - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)6s
308	6	Ar II	308,502675	32405,2194	3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>1</sup> D)4p - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)5d
309	7	Ar II	309,340173	32317,4899	3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)4p - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)4d
336	2	Ar III	335,853046	29766,3734	3s <sup>2</sup> 3p <sup>3</sup> ( <sup>2</sup> D°)4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>3</sup> ( <sup>2</sup> D°)4p
337	3	Ar II	337,643578	29608,5267	3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>1</sup> D)4p - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>1</sup> D)4d
358	2	Ar II	357,661538	27951,4148	3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)4p - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)4d
416	3	Ar I	415,859100	24039,8301	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )5p
420	3	Ar I	420,067500	23798,9942	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )5p
517	3	Ar II	516,577292	19352,7968	3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)4p - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>1</sup> S)3d
696	133	Ar I	696,543000	14352,6566	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
707	43	Ar I	706,721700	14145,9401	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
715	5	Ar I	714,704100	13987,9486	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
727	27	Ar I	727,293500	13745,8188	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
738	55	Ar I	738,398000	13539,1023	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
750	63	Ar I	750,386800	13322,7918	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
751	52	Ar I	751,465100	13303,6742	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
763	305	Ar I	763,510500	13093,7918	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
772	141	Ar I	772,420700	12942,7514	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
795	66	Ar I	794,817600	12578,0434	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
801	39	Ar I	801,478500	12473,51	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
802	53	Ar II	801,752791	12469,2432	3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>1</sup> D)4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P)4p
810	64	Ar I	810,369200	12336,662	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
811	163	Ar I	811,531100	12318,9996	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
827	68	Ar I	826,452100	12096,589	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
841	51	Ar I	840,820900	11889,8725	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
843	54	Ar I	842,464700	11866,6722	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
852	23	Ar I	852,144100	11731,881	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4p
867	3	Ar I	866,794300	11533,5946	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
912	72	Ar I	912,296700	10958,339	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
922	11	Ar I	922,449800	10837,7242	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>1/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
966	8	Ar I	965,778600	10351,5012	3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4s - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>5</sup> ( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )4p
981	2	Ar II	981,441000	10186,3065	3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P <sub>0</sub> )4f - 3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup> ( <sup>3</sup> P <sub>0</sub> )5g

**Tabelle A 11: detektierte Ionen und deren Elektronenkonfiguration und Elektronenübergangsenergie im Stickstoff-Plasma**

Optisches Spektrum		Informationen aus der Datenbank [NIST, 2012]			
gemessene Wellenlänge / nm	gemessene Intensität / (counts/ms)	Ion	Ritz-Wellenlänge / nm	$\Delta E = E_k - E_i = h \cdot \nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Elektronenkonfiguration
242	3	N IV	242,6540	41198,4	1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P <sub>3/2</sub> )3d - 1s <sup>2</sup> 2s5d
313	2	N III	312,5280	31987,9	2s <sup>2</sup> p( <sup>3</sup> P°)4s - 2p <sup>2</sup> ( <sup>3</sup> P)3s
316	5	N V	316,1370	31622,7	1s <sup>2</sup> 5p - 1s <sup>2</sup> 6s
337	25	N III	336,7360	29688,3	2s <sup>2</sup> p( <sup>3</sup> P°)3s - 2s <sup>2</sup> p( <sup>3</sup> P°)3p
354	5			0	
357	17			0	
371	2	N IV	371,4430	26914,4	1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P°)3p - 1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )3d
373	2	N IV	373,5430	26763,1	1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P°)3p - 1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )3d
375	4	N IV	374,7540	26676,6	1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )3s - 1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )3p
380	8			0	
399	3	N II	399,4997	25024,23	2s <sup>2</sup> 2p3s - 2s <sup>2</sup> 2p3p
406	2	N IV	405,7760	24637,2	1s <sup>2</sup> 2s3p - 1s <sup>2</sup> 2s3d
500	4	N II	500,1474	19988,53	2s <sup>2</sup> 2p3p - 2s <sup>2</sup> 2p3d
517	3	N II	517,0156	19336,39	2s2p2( <sup>4</sup> P)3p - 2s2p2( <sup>4</sup> P)3d
981	2	N I	981,0010	10190,88	2s <sup>2</sup> 2p2( <sup>3</sup> P)3p - 2s <sup>2</sup> 2p2( <sup>3</sup> P)3d
242	3	N IV	242,6540	41198,4	1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )3d - 1s <sup>2</sup> 2s5d
313	2	N III	312,5280	31987,9	2s2p(3P°)4s - 2p <sup>2</sup> ( <sup>3</sup> P)3s
316	5	N V	316,1370	31622,7	1s <sup>2</sup> 5p - 1s <sup>2</sup> 6s
337	25	N III	336,7360	29688,3	2s2p( <sup>3</sup> P°)3s - 2s2p( <sup>3</sup> P°)3p
354	5			0	
357	17			0	
371	2	N IV	371,4430	26914,4	1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P°)3p - 1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )3d
373	2	N IV	373,5430	26763,1	1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P°)3p - 1s <sup>2</sup> 2p( <sup>2</sup> P° <sub>3/2</sub> )3d

**Tabelle A 12: detektierte Ionen und deren Elektronenkonfigurationen und Elektronenübergangsenergie im Sauerstoff-Plasma**

Optisches Spektrum		Informationen aus der Datenbank [NIST, 2012]			
gemessene Wellenlänge / nm	gemessene Intensität / (counts/ms)	Ion	Ritz-Wellenlänge / nm	$\Delta E = E_k - E_i = h \cdot \nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Elektronenkonfiguration
242	2	O II	242,5567	41214,96	2s <sup>2</sup> 2p <sup>2</sup> ( <sup>1</sup> D)3s - 2s <sup>2</sup> 2p <sup>2</sup> ( <sup>3</sup> P)4p
517	2	O II	517,5903	19314,919	2s <sup>2</sup> 2p <sup>2</sup> ( <sup>3</sup> P)3p - 2s <sup>2</sup> 2p <sup>2</sup> ( <sup>3</sup> P)3d
777	2	O I	777,1944	12863,254	2s <sup>2</sup> 2p <sup>3</sup> ( <sup>4</sup> S°)3s - 2s <sup>2</sup> 2p <sup>3</sup> ( <sup>4</sup> S°)3p
981	2	O II	980,6760	10194,248	2s <sup>2</sup> 2p <sup>2</sup> ( <sup>3</sup> P)4f D - 2s <sup>2</sup> 2p <sup>2</sup> ( <sup>3</sup> P)5g

## 8. Literaturnachweis

[avantes, 2012]

Avantes – solutions in spectroscopy. Webseite, 2012.  
<http://www.avantes.com/Sensitivity.html>; besucht April 2012

[Bergmann, 1992]

Christian Bahr, Thomas Dorfmueller, Helmut Haberland, Gerd Heppke, Siegfried Hess, Harald Jockusch, Klaus Lüders, Joachim Seidel, Roger Thull, Harald Tschesche, Burkhard Wende. *Lehrbuch der Experimentalphysik – Band 5 – Vielteilchensysteme*. Lehrbuch de Gruyter Verlag, ISBN 3-11-010978-6, 1992

[Bücker, 1968]

H. Bücker und G. Horneck. *Untersuchungen über die Wirkung von Vakuum und Strahlung auf Escherichia coli*. Auszug aus dem Fachbuch *Radiation and Enviromental Biophysics*. November 1968

[bionumbers, 2012]

B10NUMB3R5 The database of useful biological numbers. Website, 2012.  
<http://www.bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?&id=106174&ver=4&trm=Pseudomonas>; besucht März 2012

[Czihak, 1990]

Czihak, Langer, Ziegler. *Biologie*. Springer-Lehrbuch 1990

[dsmz, 2012]

Leibnitz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Webseite 2012. [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de); besucht März 2012

[Einschütz, 2004]

Kathrin Einschütz. *Wirksamkeitsprüfung verschiedener Verfahren zur Vermeidung der Keimbelastung auf Handgeräten der Fleischgewinnung*. Dissertation FU Berlin, April 2004



[Grießner, 2011]

Matthias Grießner. *Grenzflächenmodifizierung von Mikrosystemen für biochemische Assays*. Dissertation, Juli 2011

[Hellweg, 2001]

Christine E. Hellweg. *Nachweis UV-induzierter Genaktivierung in Säugerzellen mit Hilfe eines stabil in das Genom integrierten GFP-Vektors*. Dissertation FU-Berlin, Juli 2001

[Herning, 2002]

Ekkert Hering, Rolf Martin, Martin Stohrer. *Physik für Ingenieure*. Lehrbuch, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002

[Hollahan, 1974]

John R. Hollahan and Alexis T. Bell. *Techniques and Applications of Plasma Chemistry*. John Wiley Sons Inc, 12 1974

[Holleman, 1995]

A. F. Holleman, Egon Wiberg. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Lehrbuch 101. Auflage Walter-de-Gruyter-Verlag Berlin New York, 1995

[Kendrew, 1958]

J. C. Kendrew, C. Bodo, H. M. Dintzis, R. C. Parrish, H. Wyckoff, D. C. Phillips. *A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis*. Nature, 1958

[Kessler, 1988]

Heinz-Gerhard Kessler. *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik – Molkereitechnologie*. Verlag A. Kessler, 1988

[Kramer, 2010]

Prof. Dr. Axel Kramer, Prof. Dr. Ojan Assadian, Dr. rer. nat. H. Below, Claudia Bender, Aylin Hammann. *Perspektiven der Plasmamedizin*. Artikel der Fachzeitschrift Vakuum in Forschung und Praxis, April 2010

[Kramme, 2007]

Rüdiger Kramme. *Medizintechnik*. Lehrbuch, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007

[Krisko, 2010]

Anita Krisko, Miroslav Radman. *Protein damage and death by radiation in Escherichia coli and Deinococcus radiodurans*. PNAS August 2010

[Laroussi, 2006]

Mounir Laroussi, Claire Tendero, Xinpei Lu, Sudhakar Alla, Wayne L. Hynes. *Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil*, Artikel Fachzeitschrift Plasma Process. Polym., April 2006

[Leisner, 2009]

Prof. Thomas Leisner. *Troposphärische Chemie I*. Vorlesungsskript Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Institut für Umweltphysik; 2009

[Luttmann, 2009]

Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper, Daniel Myrtek. *Der Experimentator – Immunologie*. Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag, 2009

[mb-systemtechnik, 2012]

MB Systemtechnik GbR. Webseite 2012. [www.mb-systemtechnik.de](http://www.mb-systemtechnik.de), besucht März 2012

[Meschede, 2004]

Dieter Meschede. *Gerthesen Physik – Die ganze Physik zum 21. Jahrhundert*. Lehrbuch, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004

[Murray, 2007]

Patrick R. Murray, Ellen Jo Bason, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology – 9th edition*. ASM Press Washington D.C., 2007

[Pedrotti, 2002]

Frank L. Pedrotti, Leno S. Pedrotti, Werner Bausch, Hartmut Schmidt. *Optik für Ingenieure*. Lehrbuch Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2002

[Pfützner, 2003]

Helmut Pfützner. *angewandte Biophysik*. Lehrbuch, Verlag SpringerWienNewYork, 2003

[NIST, 2012]

National Institut of Standards and Technology. U.S. Department of Commerce. Webseite 2012. [http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines\\_form.html](http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html), besucht März 2012

[Reinelt, 2008]

Kerstin Reinelt. *Wirkung von Ozon auf A549 Zellen und L929 Zellen invitro*. Dissertation Universität München, 2008

[Schägger, 1991]

H. Schägger, G.von Jagow: *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Analytische Biochemie, Dezember 1991

[Stahl, 1985]

Egon Stahl, G. Rau und H. Kaltwasser. *Hochdruck-Behandlung von Mikroorganismen*. Auszug aus dem Fachbuch *Naturwissenschaften* Springer Verlag 1985

[Steinbüchel, 2003]

Steinbüchel, Oppermann-Sanio. *Mikrobiologisches Praktikum*. Lehrbuch Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2003

[Volkmer, 2007]

Martin Volkmer. *Radioaktivität und Strahlenschutz*. Informationskreis Kernenergie, 2007

[Weißmantel, 2009]

Prof. Dr. Steffen Weißmantel. *Physikalische Technologien*. Vorlesungsskript Hochschule Mittweida 2009

[Wintermantel, 2009]

Erich Wintermantel, Suk-Woo Ha. *Medizintechnik – Life Science Engineering*. Lehrbuch Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 2009

[Zhang, 1994]

Z. Zhang, D. L. Smith. *Probing noncovalent structural features of proteins by mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews. 1994